

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**Distroglicanopatías: estudios genéticos y funcionales de la
glicosiltransferasa POMGNT1. Caracterización
glicoproteómica del alfa-distroglicano nativo de ratón**

Memoria que presenta la licenciada en Bioquímica por la Universidad de Bucarest

NUTI MADALINA RADUCU

para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis
JESÚS CRUCES PINTO
Catedrático de Universidad

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

MADRID, 2012



Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica

D. **Jesús Cruces Pinto**, Catedrático del Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA:

Que Doña **Nuti Madalina Raducu**, licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo mi dirección, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid el trabajo titulado:

Distroglicanopatías: estudios genéticos y funcionales de la glicosiltransferasa POMGNT1. Caracterización glicoproteómica del alfa-distroglicano nativo de ratón

Una vez supervisado el trabajo, estoy de acuerdo con los métodos empleados y avalo los resultados obtenidos, y asimismo considero que reúne todos los requisitos necesarios en cuanto a originalidad y calidad para ser presentado como Tesis Doctoral con el objeto de optar al título de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a todos los efectos firmo el presente certificado en,

Madrid, 7 de mayo de 2012

Fdo.: Jesús Cruces Pinto
Director de la Tesis

A mi familia

*Queda prohibido no sonreír a los problemas, no luchar por lo que quieres,
abandonarlo todo por miedo, no convertir en realidad tus sueños.*

(Pablo Neruda)

No se sale adelante celebrando éxitos sino superando fracasos.

(Orison Swett Marden)

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todas las personas que directa o indirectamente han contribuido a la realización de esta tesis doctoral.

A mi director de tesis Jesús Cruces por confiar en mi, por darme la enorme posibilidad de empezar mi “aventura científica española” en su laboratorio y por inculcarme la rigurosidad y honestidad científica.

A todos mis compañeros de laboratorio. A Rocío por iniciarme en los primeros experimentos del laboratorio y a Oihane, quien fue mi mejor amiga durante los cuatro años de tesis, por todos los momentos inolvidables tanto dentro como fuera del laboratorio y por los innumerables viajes a París, Venecia, Oporto..., por las cañas, las compras y las horas de gimnasio. A Marcos por resolver mis dudas relacionadas con la tecnología y con algún que otro experimento, y por sus intentos fallidos de corregir mi postura frente a la mesa de ordenador durante la escritura de la tesis. A las nuevas incorporaciones: Miriam y Laura. Espero que una vez defendida la tesis pueda dedicaros más tiempo.

Durante la realización de la tesis he tenido la enorme oportunidad de trabajar “mano a mano” con tres técnicos maravillosos y a los que agradezco enormemente: Cristina, Belén e Isidro.

A Cristina, o mejor dicho... “Idolita”, por su honestidad, devoción e implicación absoluta. Gracias por ser como eres, por tener siempre una sonrisa en los labios y por animarme en todo momento.

A Belén por su disponibilidad, su lealtad y por su apoyo incondicional en la búsqueda de soluciones para los experimentos que se nos resistían. Espero que sigamos siendo muy buenas amigas.

A Isidro, alias “PCR’s specialist”, por su paciencia infinita, por hacerme ver siempre el lado positivo de las cosas y por la frase de ánimo que me dejó en un post-it en su último día en el laboratorio: “¡¡Please Smile!! Aunque es difícil a veces...”

A las residentes María y Mercedes por todos el cariño que me han dado durante su estancia en el laboratorio.

Agradezco la ayuda del equipo de la Universidad Rey Juan Carlos: Antonio, Adriana y Oscar, por ayudarme a buscar soluciones para los experimentos complicados y por transmitir siempre optimismo y tranquilidad.

¡¡Esther!! no tengo palabras para agradecerte por todo el cariño y el apoyo incondicional que me has dado durante todos estos años. Siempre has estado allí para escucharme, animarme y darme las mejores soluciones para todos los problemas que me han surgido, y han sido unos cuantos... Gracias por compartir conmigo tu experiencia y conocimiento. Todo hubiera sido mucho más complicado sin tu ayuda y me siento muy afortunada por ser tu amiga.

Agradecimientos

A Mercedes “la gallega” por la amistad sincera que hemos formado durante su estancia en el laboratorio B-19, por las palabras de ánimo y por la paciencia que ha tenido siempre conmigo. Gracias a tus apelativos cariñosos hay algunos que piensan que soy polaca ...

A Carmen del laboratorio B-19 por escucharme, ayudarme y por los buenos consejos que me ha dado durante todo este tiempo.

Agradezco a mi amigo David, alias Dioni, la alegría que me ha contagiado durante todos estos años, por ser un amigo fiel, por preocuparse siempre por mí, por animarme y apoyarme día a día. ¡¡Tus peques te echan de menos !!

Tengo palabras de agradecimiento y aprecio para muchísimos compañeros del departamento de Bioquímica y como se puede entender, por límite de espacio, no podría nombrarlos a todos. Me gustaría mencionar a: Teresa, Cristina, Milena y Álvaro del laboratorio B-19, a Lucía del laboratorio B-20 y a Bea del laboratorio B-13.

Agradezco también a Juan Manuel Zapata (B-18) y a los profesores Miguel Fernández Moreno (B-19) y José González Castaño (B-13) porque no han dudado en apoyarme cuando más lo he necesitado.

A todas mi amigas de Rumanía: Nicoleta, Cristina, Irina, Elena “Tomi”, Mariana, Elena y Vali por hacerme sentir muy querida cada vez que vuelvo a casa.

A Corina por su comportamiento impecable, por sus palabras de ánimo y aliento en muchos momentos difíciles .

A toda mi familia por su infinito amor. Especialmente, a mi madre por todos los sacrificios que ha hecho y que me permiten escribir hoy estas líneas, por anteponer siempre nuestras necesidades a las suyas, por su paciencia y comprensión.

A mi padre, espero que estés donde estés te sientas muy orgulloso de mí.

A mis abuelos por el amor incondicional, la protección, los consejos que me han dado y por enseñarme los valores de la vida. Esta tesis es el resultado de lo que me habéis enseñado siempre: ser una persona honesta, responsable y entregada a su trabajo.

A mi hermano por cuidar de mí en muchos momentos de la vida, a mi cuñada, y a mis sobrinos Robert y Irene por ser la fuente de alegría en mi familia.

Finalmente, me gustaría agradecerte a ti Andrés por tu apoyo moral, por tu paciencia, por creer en mí más que nadie, por transmitirme esa tranquilidad que te caracteriza y por ayudarme a ser mejor cada día.

¡¡Muchas gracias a todos !!

Resumen / Abstract

Resumen

Las distroglicanopatías representan un grupo muy heterogéneo de distrofias musculares congénitas caracterizadas por hipoglicosilación del α -distroglicano (α -DG). La síntesis del principal O-manosilglicano NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α -O-Ser/Thr, esencial para la correcta unión del distroglicano a las proteínas de la matriz extracelular, se inicia con la incorporación de residuos de manosa sobre serinas y treoninas del dominio de tipo mucina de α -DG catalizada por las glicosiltransferasas POMT1 y POMT2 (*proteínas O-manosiltransferasas 1 y 2*).

El segundo paso está catalizado por POMGNT1 (proteína O-manosa beta-1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa 1), que transfiere residuos de N-acetilglucosamina sobre O-manosa. Se desconocen todavía las otras enzimas implicadas en la extensión de este tetrasacárido. Las mutaciones en *POMGNT1* se detectaron inicialmente en pacientes con la enfermedad músculo-ojo-cerebro (MEB). Posteriormente, el espectro fenotípico se expandió hasta incluir el síndrome de Walker-Warburg (WWS), la distrofia muscular tipo Fukuyama (FCMD) y la distrofia de cinturas tipo 2O (LGMD2O).

En este trabajo, describimos dos pacientes con distroglicanopatía con características fenotípicas muy distintas y que presentan mutaciones en el gen *POMGNT1*. Además, hemos realizado el análisis funcional completo del promotor silvestre del gen *POMGNT1* y hemos definido las consecuencias transcripcionales y traduccionales de la primera mutación conocida en la región promotora del gen *POMGNT1* causante del fenotipo LGMD2O.

Además, para entender los efectos biológicos debidos a una glicosilación defectuosa del α -DG se necesita elucidar sus características estructurales tanto en tejidos de individuos sanos como de enfermos. Para este propósito, es necesario el uso de técnicas que permitan la caracterización de los perfiles de glicosilación del α -DG a partir de muestras biológicas complejas. Describimos la purificación y caracterización mediante espectrometría de masas de los O-glicanos del α -DG procedente de mioblastos de ratón C2C12 diferenciados a miotubos.

Abstract

Dystroglycanopathies are a heterogeneous group of congenital muscular dystrophies characterized by hypoglycosylation of α -dystroglycan (α -DG). Synthesis of the main O-mannosylglycan NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α -O-Ser/Thr, which is essential for dystroglycan to bind normally to proteins of the extracellular matrix, begins with the addition of mannose moieties to serine and threonine residues from the mucin domain of α -DG due to the cooperative activity of the glycosyltransferases POMT1 and POMT2 (*protein O-mannosyltransferases 1 and 2*).

The second step is catalyzed by POMGNT1 (*protein O-mannose beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1*), which transfers N-acetylglucosamine residues to O-linked mannose. The other enzymes that complete the extension of the tetrasaccharide chain have not yet been identified. *POMGNT1* mutations were first detected in muscle-eye-brain disease (MEB). Subsequently, the clinical spectrum was expanded to include Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD), Walker-Warburg syndrome (WWS) and limb-girdle muscular dystrophy type 2O (LGMD2O).

In this work, we describe two dystroglycanopathy patients with opposite phenotypic features that carry mutations in the *POMGNT1* gene. Furthermore, we performed the complete functional analysis of the wild type *POMGNT1* gene promoter, and we defined the transcriptional and translational consequences of what is the first mutation in the promoter region of the *POMGNT1* gene known to give rise to the LGMD2O phenotype.

In order to understand the biological effects of altered glycosylation of α -DG, the structural features of this protein from healthy and diseased tissues need to be elucidated. To do so, it is necessary to use techniques that allow characterization of the glycosylation patterns of α -DG from complex biological samples. Here, we describe the purification and mass spectrometric characterization of the site-specific O-glycan structures of α -DG from the mouse C2C12 myoblasts differentiated into skeletal muscle myotubes.

Índice

ABREVIATURAS	25
INTRODUCCIÓN	35
1. Distroglicano	37
2. El complejo glicoproteico de unión a distrofina (DGC)	39
3. Glicosilación	40
3.1. N-glicosilación.....	41
3.2. O-glicosilación.....	41
3.2.1. O-glicanos de tipo mucina.....	41
3.2.2. O-manosilglicanos.....	43
4. Defectos en la O-glicosilación del α-distroglicano. Distroglicanopatías	45
4.1. Síndrome de Walker-Warburg.....	46
4.1.1. Proteínas O-manosiltransferasas.....	47
4.2. Enfermedad músculo-ojo-cerebro.....	47
4.2.1. Proteína O-manosa β 1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa 1.....	48
4.3. Distrofia muscular congénita tipo Fukuyama.....	50
4.3.1. Fukutina.....	51
4.4. Distrofias de cinturas causadas por hipoglicosilación del α -distroglicano.....	52
4.4.1. Distrofia de cinturas tipo 2I.....	52
4.4.2. Distrofia de cinturas tipo 2K.....	52
4.4.3. Distrofia de cinturas tipo 2M.....	53
4.4.4. Distrofia de cinturas tipo 2N.....	53
4.4.5. Distrofia de cinturas tipo 2O.....	53
4.5. Nuevos genes causantes de distroglicanopatías.....	55
4.5.1. Dolicol quinasa.....	55
4.5.2. Dolicol fosfato-manosa sintasa.....	55
4.5.3. Distroglicano.....	55
4.5.4. Colágeno 4 alfa 1.....	56
OBJETIVOS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	61
MATERIALES	63
1. Pacientes analizados. Características clínicas	63
1.1. Familia 1 (Paciente MEB).....	63

1.2. Familia 2 (Paciente LGMD2O).....	64
1.3. Familia 3 (Paciente WWS).....	65
2. Cepas bacterianas	66
3. Líneas celulares	66
3.1. Líneas celulares inmortalizadas.....	66
3.2. Líneas celulares primarias.....	66
4. Clones IMAGE	66
5. Vectores de clonación	66
6. Oligonucleótidos	68
7. Anticuerpos	74
7.1. Anticuerpos primarios, diluciones utilizadas y procedencia.....	74
7.2. Anticuerpos secundarios, diluciones utilizadas y procedencia.....	75
8. Reactivos, soluciones y tampones	75
MÉTODOS	76
1. Análisis molecular de los genes responsables de distroglicanopatía	76
1.1. Selección de genes candidatos.....	76
1.2. Extracción de material genético.....	76
1.3. Amplificación mediante PCR y purificación de los amplicones.....	76
1.4. Secuenciación directa y análisis de secuencias.....	77
1.5. Análisis del ADN por endonucleasas de restricción.....	77
2. Generación de construcciones plasmídicas	77
2.1. Aislamiento y clonación del promotor de <i>POMGNT1</i> humano.....	77
2.2. Generación de construcciones para el análisis del promotor de <i>POMGNT1</i>	78
2.3. Clonación de la región codificante del gen <i>POMGNT1</i> y mutagénesis dirigida... 78	
2.4. Clonación del promotor proximal para analizar los niveles de expresión de <i>POMGNT1</i>	79
2.5. Purificación de ADN plasmídico.....	79
3. Estudio de la actividad promotora del gen <i>POMGNT1</i>	80
3.1. Transfección transitoria en cultivos de células y determinación de la actividad promotora.....	80
3.2. Extracción de proteínas nucleares.....	80
3.3. Retardo y super-retardo en la movilidad electroforética (EMSA).....	81
3.4. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	81

3.5. Transcripción de ARN total a ADNc (RT-PCR).....	83
3.6. Cuantificación de la expresión génica. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	83
4. Estudio de la expresión proteica.....	84
4.1. Extracción de proteína total de líneas celulares y biopsias musculares.....	84
4.2. Determinación de la concentración proteica.....	85
4.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (Western blot).....	85
4.4. Ensayo de revestimiento con laminina (Laminin Overlay).....	85
4.5. Ensayo de inmunohistoquímica.....	86
5. Purificación y caracterización glicoproteómica del α-dystroglicano nativo de ratón.....	86
5.1. Cultivo de mioblastos de ratón (células C2C12) y diferenciación a miotubos....	86
5.2. Enriquecimiento de glicoproteínas.....	87
5.3. Inmunoprecipitación del α -dystroglicano nativo.....	88
5.4. Detección del α -dystroglicano.....	88
5.5. Análisis glicoproteómico de los O-glicopéptidos del α -dystroglicano.....	89
6. Silenciamiento estable de la expresión de FKTN en la línea celular C2C12.....	89
7. Estudios <i>in silico</i>.....	90
8. Análisis estadístico.....	90
RESULTADOS.....	91
1. Caracterización genética y molecular de pacientes con dystroglicanopatía.....	93
1.1. Análisis del estado de glicosilación del α -dystroglicano.....	93
1.1.1. Estudios de inmunofluorescencia.....	93
1.1.2. Estudios de Western blot.....	95
1.2. Análisis mutacional de los pacientes	97
1.2.1. Paciente MEB.....	97
1.2.2. Paciente LGMD2O.....	99
2. Análisis estructural y funcional de la región promotora del gen <i>POMGNT1</i> humano.....	100
2.1. Clonación y análisis de la región 5' flanqueante del gen <i>POMGNT1</i>	100
2.2. Caracterización funcional de la región promotora de <i>POMGNT1</i>	104
2.3. Detección de los factores de transcripción que regulan la expresión del gen <i>POMGNT1</i>	106
2.3.1. Ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA).....	106

2.3.2. Ensayos de super-retardo en la movilidad electroforética (<i>Supershift</i>).....	109
2.3.3. <i>Sp1</i> se une in vivo al promotor de <i>POMGNT1</i> en células COS7. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (<i>ChIP</i>).....	110
2.4. Caracterización funcional de la mutación presente en el paciente LGMD2O....	112
2.4.1. Clonación del promotor de <i>POMGNT1</i> mutado.....	112
2.4.2. El promotor del gen <i>POMGNT1</i> mutado inhibe significativamente su expresión.....	113
2.4.3. El represor transcripcional <i>ZNF202</i> se une al promotor de <i>POMGNT1</i> mutado.....	114
2.4.4. Disminución de los niveles de ARNm y proteína de <i>POMGNT1</i> en el paciente LGMD2O.....	117
3. Purificación y caracterización glicoproteómica del α-dístroglicano nativo de miotubos de ratón C2C12.....	119
3.1. Análisis de la expresión del dístroglicano y de los genes implicados en su glicosilación.....	119
3.2. Purificación del α -dístroglicano nativo de miotubos de ratón (células C2C12 diferenciadas).....	120
3.3. Caracterización glicoproteómica del α -dístroglicano de ratón.....	122
3.3.1. Baja heterogeneidad de las estructuras “core” de los O-glicanos de tipo Hex-O-Ser/Thr.....	123
3.3.2. Alta heterogeneidad de las estructuras “core” de los O-glicanos de tipo HexNAc-O-Ser/Thr.....	124
3.4. Purificación del α -dístroglicano nativo de células C2C12 carentes de <i>FKTN</i>	141
3.5. Purificación del α -dístroglicano nativo de fibroblastos de piel procedentes de un paciente con síndrome de Walker-Warburg por mutaciones en el gen <i>FKTN</i>	142
DISCUSIÓN.....	147
1. Caracterización histológica y bioquímica de los pacientes.....	149
2. Caracterización genética de los pacientes.....	151
2.1. Paciente MEB.....	151
2.2. Paciente LGMD2O.....	152
3. Caracterización funcional de la región promotora del gen <i>POMGNT1</i>.....	153
4. Caracterización funcional de la mutación -83_-75dup encontrada en el paciente LGMD2O.....	156
5. Caracterización glicoproteómica del α-dístroglicano nativo de ratón.....	157

6. Estudio de la función de FKTN.....	162
CONCLUSIONES.....	165
BIBLIOGRAFÍA.....	169
ANEXO I.....	185
ANEXO II.....	199

Abreviaturas

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario o codificante
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
α-DG	Alfa-distroglicano
AML-1A	Proteína 1A de la leucemia mieloide aguda (en inglés Acute myeloid leukemia 1A protein)
AP1	Proteína activadora 1 (en inglés Activator protein 1)
Arg	Arginina
ARNm	ARN mensajero
Asn	Asparagina
β-DG	Beta-distroglicano
BSA	Albúmina de suero bovino (en inglés Bovine serum albumin)
C-terminal	Carboxilo-terminal
C2C12	Línea celular de mioblastos de ratón
CDG	Déficit congénito de glicosilación (en inglés Congenital disorders of glycosylation)
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina (en inglés Chromatin immunoprecipitation)
CID-MS	Espectrometría de masas con disociación inducida por colisión (en inglés Collision-induced dissociation mass spectrometry)
CK	Creatina quinasa
CMD	Distrofia muscular congénita (en inglés Congenital muscular dystrophy)
CMD-MR	Distrofia muscular congénita con retraso mental (en inglés Congenital muscular dystrophy with mental retardation)
CMV	Citomegalovirus
COL4A1	Cadena alfa 1 del colágeno IV
COS7	Células embrionarias de riñón de mono verde africano
cpm	Cuentas por minuto
CTP	Citidina trifosfato (en inglés Cytidine triphosphate)
Cys	Cisteína
Da	Dalton/s
DAG1	Distroglicano (en inglés Dystrophin-associated glycoprotein 1)
DAPI	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (en inglés 4',6-diamidino-2-phenylindole)

DG	Distroglicano
DGC	Complejo glicoproteico de unión a distrofina (en inglés Dystrophin glycoprotein complex)
DMD	Distrofia muscular tipo Duchenne
DMEM	Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (en inglés Dulbecco's modified eagle's medium)
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
Dol-P	Dolicol fosfato (en inglés Dolichol phosphate)
DOLK	Dolicol quinasa
DPM (Dol-P-Man)	Dolicol fosfato-manosa (en inglés Dolichol phosphate-mannose)
DTT	1,4-Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Ensayo quimioluminiscente mejorado (en inglés Enhanced chemiluminescence)
EDTA	Sal disódica del ácido etileno diamino tetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (en inglés Epidermal growth factor)
EGTA	Etilen glicol del ácido tetraacético
EMSA	Ensayo de retardo en la movilidad electroforética (en inglés Electrophoretic mobility shift assay)
Ets-1	Factor transformante 1 específico E26 (en inglés E26-transformation-specific 1)
FBS	Suero fetal bovino (en inglés Foetal bovine serum)
FCMD	Distrofia muscular congénita de tipo Fukuyama (en inglés Fukuyama type congenital muscular dystrophy)
FKRP	Proteína relacionada con la fukutina (en inglés Fukutin related protein)
FKTN	Fukutina (en inglés Fukutin)
FT-ICR-MS	Espectrometría de masas con resonancia de ciclotrón de iones con transformada de Fourier (en inglés Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry)
Fuc	Fucosa
GAG	Glicosaminoglicanos
Gal	Galactosa

GalNAc	N-acetilgalactosamina
GalNAc-O-Ser/Thr	O-glicanos de tipo mucina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (en inglés Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
GDP-Man	Guanosina bifosfato manosa (en inglés Guanosine diphosphate mannose)
Glc	Glucosa
GlcA	Ácido glucurónico
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GnTI	N-acetilglucosaminiltransferasa I (en inglés N-Acetyl glucosaminyltransferase I)
GPI	Glicosilfosfatidilinositol (en inglés Glycosylphosphatidylinositol)
Grb2	Proteína unida al receptor del factor de crecimiento 2 (en inglés Growth factor receptor-bound protein 2)
HBL100	Células de epitelio mamario humano (en inglés Human breast epithelial cell line 100)
HEK	Células embrionarias humanas de riñón (en inglés Human embryonic kidney)
HEPES	Ácido [N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano-sulfónico] (en inglés [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid])
Hex	Hexosa
HexNAc	N-acetilhexosamina
hLys	Hidroxilisina
HSV	Virus del herpes simple (en inglés Herpes simplex virus)
IHQ	Inmunohistoquímica
Ile	Isoleucina
IP	Inmunoprecipitación
Kb	Kilobases
KCl	Cloruro potásico
kDa	Kilodalton/s
KRAB	Dominio asociado de Krüppel (en inglés Krüppel-associated box)
LacNAc	N-acetilactosamina

LC-MS/MS	Espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía de líquidos (en inglés Liquid chromatography tandem mass spectrometry)
Leu	Leucina
LGMD	Distrofia muscular del anillo óseo, o distrofia muscular de cinturas (en inglés Limb-girdle muscular dystrophy)
LGMD-MR	Distrofia muscular del anillo óseo, o distrofia muscular de cinturas con retraso mental (en inglés Limb-girdle muscular dystrophy with mental retardation)
LGMD2I	Distrofia muscular del anillo óseo tipo 2I, o distrofia muscular de cinturas tipo 2I (en inglés Limb-girdle muscular dystrophy type 2I)
LGMD2K	Distrofia muscular del anillo óseo tipo 2K, o distrofia muscular de cinturas tipo 2K (en inglés Limb-girdle muscular dystrophy type 2K)
LGMD2M	Distrofia muscular del anillo óseo tipo 2M, o distrofia muscular de cinturas tipo 2M (en inglés Limb-girdle muscular dystrophy type 2M)
LGMD2N	Distrofia muscular del anillo óseo tipo 2N, o distrofia muscular de cinturas tipo 2N (en inglés Limb-girdle muscular dystrophy type 2N)
LGMD2O	Distrofia muscular del anillo óseo tipo 2O, o distrofia muscular de cinturas tipo 2O (en inglés Limb-girdle muscular dystrophy type 2O)
LiCl	Cloruro de litio
LyF-1	Factor de transcripción linfoide 1 (en inglés Lymphoid transcription factor 1)
mA	Miliamperios
Man	Manosa
Man-O-Ser/Thr	O-manosilglicanos
MDC1C	Distrofia muscular congénita tipo 1C (en inglés Congenital muscular dystrophy type 1C)
MDC1D	Distrofia muscular congénita tipo 1D (en inglés Congenital muscular dystrophy type 1D)

MEB	Enfermedad músculo-ojo-cerebro (en inglés Muscle-Eye-Brain)
MEC	Matriz extracelular
Met	Metionina
MgCl₂	Cloruro de magnesio
μg	Microgramo/s
μl	Microlitro/s
μm	Micrometro/s
μM	Micromolar
mg	Miligramo/s
mm	Milímetro/s
mM	Milimolar
MZF1	Factor 1 mieloide con dedos de zinc (en inglés Myeloid zinc finger 1)
N-terminal	Amino-terminal
NaHCO₃	Bicarbonato sódico
NeuAc	Ácido neuramínico
NeuGc	Ácido N-glicolil neuramínico
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (en inglés Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
ng	Nanogramo/s
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal (en inglés Neuronal nitric oxide synthase)
OMIM	Herencia mendeliana en el hombre en red (en inglés Online Mendelian Inheritance in Man)
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (en inglés Phosphate-buffer saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (en inglés Polymerase chain reaction)
Phe	Fenilalanina (en inglés Phenylalanine)
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (en inglés phenyl-methyl-sulfonyl fluoride)

PMT	Proteína manosiltransferasa (en inglés Protein mannosyltransferase)
POMGNT1	Proteína O-manosa β -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa 1 (en inglés Protein O-linked mannose beta1,2-N-acetylglucosaminyltransferase)
POMT1	Proteína O-manosiltransferasa 1 (en inglés Protein O-mannosyltransferase 1)
POMT2	Proteína O-manosiltransferasa 2 (en inglés Protein O-mannosyltransferase 2)
PVDF	Fluoruro de polivinilideno (en inglés Polyvinylidene fluoride)
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (en inglés Reverse transcription polymerase chain reaction)
SDS	Dodecil sulfato de sodio (en inglés Sodium dodecyl sulfate)
Ser	Serina
shRNA	Horquilla pequeña de RNA (en inglés short hairpin RNA)
Sp1	Proteína de especificidad 1 (en inglés Specificity protein 1)
SRF	Factor de respuesta al suero (en inglés Serum response factor protein)
T^a	Temperatura
TALEN	Nucleasas efectoras relacionadas con los activadores transcripcionales (en inglés Transcription activator-like effector nucleases)
TBE	Tampón tris-ácido bórico-EDTA
TBS-T	TBS con 0,1% Tween 20
TBS	Solución tamponada con Tris-HCl (en inglés Tris buffered saline)
Thr	Treonina
tk	Timidina quinasa
TSR	Repeticiones tipo trombospondina (en inglés trombospondin type I repeats)
TSS	Sitio de iniciación de la transcripción (en inglés Transcription start site)

Tyr	Tirosina
UDP-GlcNAc	Uridina difosfato N-Acetilglucosamina
UTR	Secuencia no traducida (en inglés Untranslated region)
v-Myb	Protooncogén homólogo al gen transformador del virus de la mieloblastosis aviar [en inglés Myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)]
WB	Western blot
WGA	Aglutinina de germen de trigo (en inglés Wheat germ agglutinin)
WT	Fenotipo o genotipo silvestre (en inglés Wild type)
WWS	Síndrome de Walker-Warburg (en inglés Walker-Warburg syndrome)
Xyl	Xilosa
ZNF202	Proteína 202 con dedos de zinc (en inglés Zinc finger protein 202)

Introducción

Durante los últimos 20 años, después de su identificación y caracterización molecular, el distroglicano (DG) ha ocupado un papel central en biología y biomedicina. El DG es una molécula de adhesión celular con expresión ubicua, y que se une con alta afinidad a proteínas como laminina, agrina, perlecano y neurexina, formando una unión estructural fundamental entre el citoesqueleto y la matriz extracelular (MEC). El concepto inicial del DG como simple receptor de unión a la laminina ha ido cambiando, ya que nuevas funciones y nuevos ligandos se están describiendo. Los trabajos iniciales acerca de su función se han centrado principalmente en el papel que desempeña en la patogénesis de las enfermedades neuromusculares. Sin embargo, se ha demostrado que es una proteína altamente versátil ya que participa en embriogénesis, señalización celular, progresión del cáncer y entrada de partículas virales.

1. Distroglicano

Tras su descubrimiento en el año 1987 como una proteína de unión a laminina (denominada *cranina*) localizada en la membrana plasmática de distintos tipos celulares (Smalheiser and Schwartz, 1987), el DG se clonó y se caracterizó por primera vez como parte del complejo proteico multimérico denominado complejo glicoproteico de unión a distrofina (DGC) en el músculo esquelético (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). Además de su expresión en músculo esquelético, el DG se expresa en músculo liso, corazón y también en muchos tejidos no musculares como cerebro y nervio periférico (Durbeej et al., 1998).

El DG es una proteína heterodimérica formada por dos subunidades, α y β , codificadas en vertebrados por un único gen *DAG1*, localizado en humanos el cromosoma 3p21 (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993). Las dos subunidades se traducen a partir de un único ARNm como un propéptido de 895 aminoácidos, y que posteriormente sufre un corte proteolítico en la posición 653, dando lugar a las dos proteínas α - y β -DG que se mantienen unidas por uniones no covalentes (Deyst et al., 1995) (Figura 1). Se desconoce el significado de este corte proteolítico, pero se ha demostrado que este tipo de procesamiento es esencial para la función muscular normal, ya que el modelo animal de ratón que presenta un cambio en el sitio de corte, de serina a alanina (p.Ser654Ala), desarrolla distrofia muscular (Jayasinha et al., 2003).

El α -DG es una proteína extracelular altamente glicosilada y contiene un dominio de tipo mucina, rico en residuos de serina, treonina y prolina, que conecta los

dominios globulares C- y N-terminales (Brancaccio et al., 1995). Aunque la secuencia primaria del α -DG predice un peso molecular de 72 kDa, en Western blot se detecta en un rango amplio que varía desde 120 kDa en cerebro, músculo liso y nervio periférico hasta 156 kDa en músculo esquelético (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992, Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993, Durbeej et al., 1998). El dominio N-terminal del α -DG sufre un corte proteolítico entre los residuos Arg312 y Gln313, mediado por una convertasa denominada furina, dando lugar a un polipéptido de 38 kDa (Kanagawa et al., 2004, Singh et al., 2004). Este fragmento se ha detectado en el medio de cultivo de distintos tipos celulares, así como en el suero humano normal y en el líquido cerebroespinal (Saito et al., 2008, Schutzer et al., 2010). Se desconoce el significado fisiológico de este polipéptido, pero se ha sugerido una posible función como biomarcador en distintas enfermedades neurodegenerativas y neuromusculares (Saito et al., 2008, Bozzi et al., 2009).

El β -DG es una proteína integral de membrana con un peso molecular de 45 kDa y contiene un dominio extracelular N-terminal, una región transmembrana y un dominio C-terminal rico en residuos de prolina, que presenta múltiples sitios de interacción con otras proteínas.

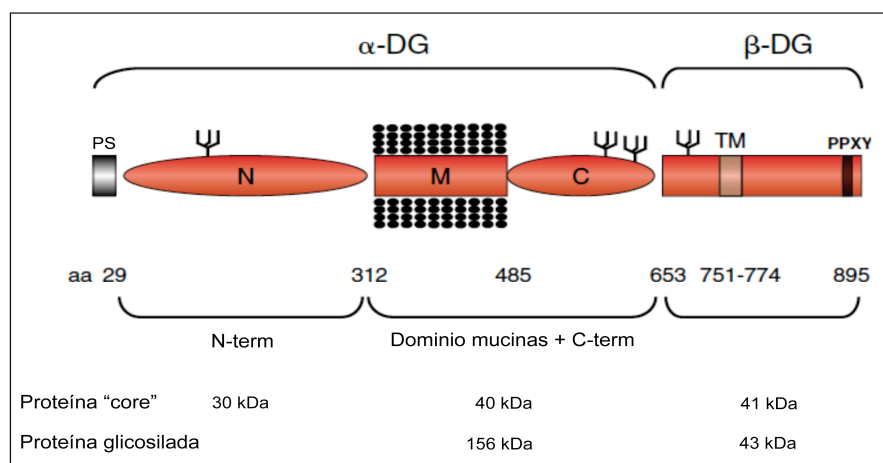


Figura 1. Estructura del distroglicano. El dominio N-terminal del α -distroglicano maduro se elimina tras un corte proteolítico catalizado por la convertasa furina entre los residuos Arg312 y Gln313. Los O-glicanos se indican con círculos negros, mientras que los N-glicanos se indican con ramificaciones. PS: péptido señal; TM: dominio transmembrana; PPXY: secuencia de unión a distrofina. Los pesos moleculares indicados en la parte inferior representan la masa proteica en ausencia ("core") o presencia de glicosilación. Adaptada de Barresi y Campbell (Barresi and Campbell, 2006).

Además, el β -DG puede sufrir extracelularmente un corte proteolítico entre los residuos His715 y Leu716, bajo la actividad de las metaloproteasas (MMP) 2 y 9, dando

lugar a una proteína transmembrana que no posee capacidad de interacción con el α -DG, viéndose afectada la interacción del citoesqueleto con la MEC (Yamada et al., 2001). Este procesamiento ha sido asociado con procesos patológicos como la invasión tumoral, la encefalitis autoinmune y las distrofias musculares (Matsumura et al., 2003, Jing et al., 2004, Agrawal et al., 2006).

2. El complejo glicoproteico de unión a distrofina (DGC)

La caracterización del DG se realizó inicialmente con el fin de entender las bases moleculares de las distrofias musculares tipo Duchenne (DMD), ya que el DG es uno de los componentes centrales del DGC que interaccionan con la distrofina. En los pacientes con DMD, y también en el ratón *mdx* (animal modelo para el estudio de DMD), la ausencia de la distrofina genera una pérdida dramática de los otros componentes del DGC en el sarcolema (Ervasti et al., 1990, Ohlendieck and Campbell, 1991). Debido a la compleja y variable composición del DGC es difícil asignar una función general a este complejo transmembrana. En el músculo, la síntesis y el posicionamiento correcto de todos los componentes del DGC son esenciales para la estabilidad estructural del sarcolema durante los ciclos de contracción y relajación, protegiéndolo contra el daño mecánico (Allikian and McNally, 2007). Así mismo, el DGC funciona como soporte para las proteínas implicadas en señalización celular como la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), el fosfatidilinositol trifosfato, la calmodulina o la proteína unida al receptor del factor de crecimiento 2 (Grb2) (Moore and Winder, 2010).

Los componentes del DGC se han agrupado en tres subcomplejos: el subcomplejo de los sarcoglicanos, el subcomplejo del distroglicano y el subcomplejo citoplásmico constituido por distrofina, distrobrevinas y sintrofinas (Figura 2).

En el sarcolema, el β -DG interacciona intracelularmente con la distrofina o con su homóloga de expresión ubicua (utrofina), que a su vez se une al citoesqueleto de actina, y extracelularmente interacciona con el dominio C-terminal del α -DG. La interacción entre el α - y el β -DG no está condicionada por la correcta glicosilación del α -DG; en cambio se requiere la presencia del complejo de sarcoglicanos para el correcto ensamblaje del α -DG en el DGC. El β -DG interacciona también con la caveolina 3, la Grb2 y la rapsina mediante su dominio C-terminal (Barresi and Campbell, 2006).

El α -DG, a través de los residuos O-glicosídicos, establece una red de interacciones con proteínas de la MEC como la laminina, la agrina y el perlecano (Ervasti and Campbell, 1993, Bowe et al., 1994, Peng et al., 1998) y con proteínas sinápticas como la neurexina y la pikachurina (Sugita et al., 2001, Sato et al., 2008).

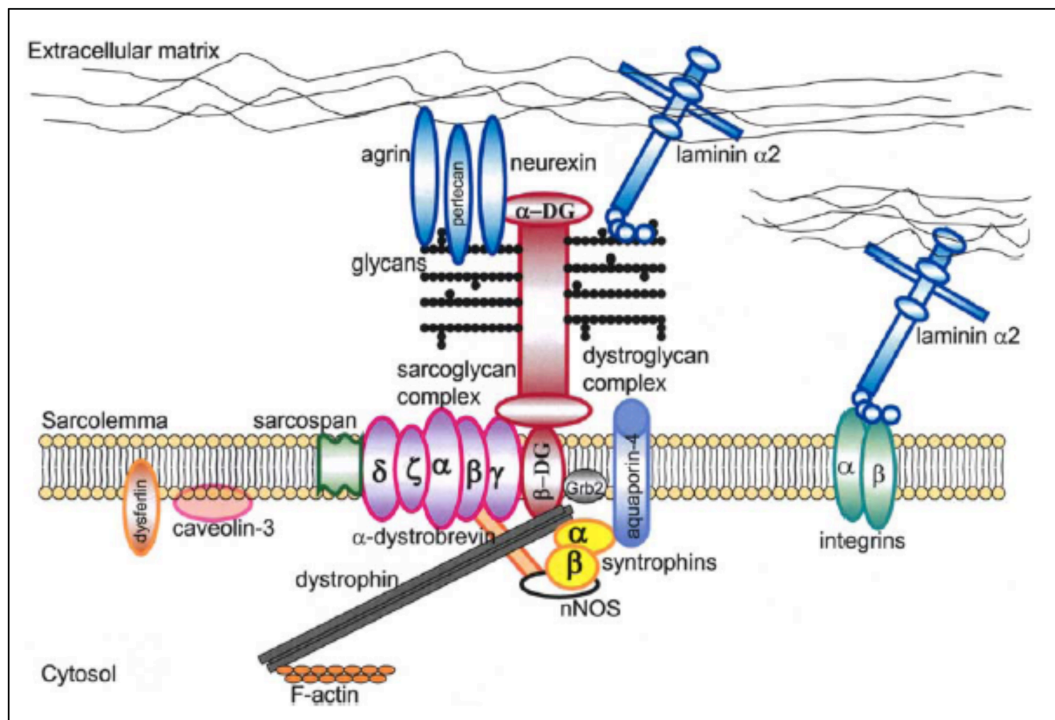


Figura 2. Complejo glicoproteico de unión a distrofina (DGC). Representación esquemática del distroglicano como componente del DGC y sus ligandos (Cohn, 2005).

3. Glicosilación

La glicosilación representa el tipo más común y más complejo de modificación postraducciona y consiste en la adición enzimática de carbohidratos a proteínas o lípidos. Se conocen alrededor de 500 genes implicados en los procesos de glicosilación, y según la base de datos SwissProt, aproximadamente el 50% de todas las proteínas sufren este tipo de modificación (Jaeken, 2003, Apweiler et al., 1999). La glicosilación juega un papel importante en procesos de infección viral y bacteriana, adhesión celular, inflamación, metástasis, diferenciación y desarrollo, regulación de la actividad enzimática y proporciona estabilidad y solubilidad a las proteínas secretadas (Kobata, 1992). La glicosilación se divide en dos grandes grupos según el tipo de enlace que se establece entre el azúcar y el aminoácido de la proteína: la N-glicosilación y la O-glicosilación.

3.1. N-glicosilación

La N-glicosilación consiste en la unión de carbohidratos al grupo amida de las asparaginas en forma de oligosacáridos $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2\text{-Asn}$. Dentro de los N-glicanos el principal residuo con el que empieza la cadena de carbohidratos es la N-acetilglucosamina (GlcNAc).

El DG contiene 4 sitios potenciales de N-glicosilación, de los cuales tres pertenecen al α -DG y uno al β -DG. La eliminación de los N-glicanos disminuye el peso molecular del α -DG en sólo 4 kDa, lo que indica que la variabilidad en su peso molecular se debe a los procesos de O-glicosilación que son específicos de tejido (Ervasti and Campbell, 1991). El tratamiento del α -DG con N-glicanasa no afecta su unión a las proteínas de la MEC lo que indica que los N-glicanos no son importantes para la unión del ligando (Ervasti and Campbell, 1993).

3.2. O-glicosilación

La O-glicosilación genera una inmensa variedad de estructuras químicas y se distingue de la N-glicosilación, tanto en el tipo de enlace, ya que los carbohidratos se añaden a residuos hidroxilo de serinas (Ser), treoninas (Thr) o hidroxilisina (hLys), como en la manera en la que se añaden los azúcares, monosacárido a monosacárido, mientras que en la N-glicosilación los azúcares se añaden en bloque. Cada monosacárido posee tres o cuatro sitios de enlace con otros azúcares y puede formar el enlace glicosídico tanto en configuración α como en β , dando lugar a estructuras ramificadas. Teóricamente, los nueve monosacáridos más comunes en humanos se pueden ensamblar en mas de 15 millones de posibles tetrasacáridos (Dove, 2001). Los O-glicanos se clasifican en siete tipos en función del primer azúcar que se encuentra unido al residuo de Ser, Thr o hLys (Tabla 1). A continuación se van a detallar tanto los O-glicanos de tipo mucina (GalNAc-O-Ser/Thr) como los O-manosilglicanos (Man-O-Ser/Thr) por ser ambos los principales O-glicanos presentes en el α -DG.

3.2.1. O-glicanos de tipo mucina

Las glicoproteínas de tipo mucina se expresan de manera ubicua en la superficie mucosa de las células y en los fluidos corporales.

En los O-glicanos de tipo mucina, el primer residuo de la cadena de carbohidratos es N-acetilgalactosamina (GalNAc) que se une covalentemente, mediante un enlace α , al grupo hidroxilo de Ser o Thr. El residuo de GalNAc se puede extender

con azúcares como galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc) o ácido siálico (ácido N-acetil neuramínico: NeuAc), pero no con manosa (Man), glucosa (Glc) o xilosa (Xyl). Existen cuatro tipos principales de estructuras “core” de glicanos GalNAc-O-Ser/Thr, designados como “core” 1 hasta “core” 4 (Figura 3), y otros cuatro tipos adicionales, desde “core” 5 hasta “core” 8. La principal diferencia entre los ocho tipos de estructuras “core” se debe al segundo azúcar y su tipo de unión (Brockhausen, 1999).

El antígeno Tn representa el tipo más sencillo de glicano GalNAc-O-Ser/Thr y consiste en un sólo residuo de GalNAc unido a Ser o Thr (GalNAc α 1-Ser/Thr). El glicano O-GalNAc “core” 1 o el antígeno T (Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr) (Figura 3) representa el tipo más común de O-glicanos de tipo mucina y se encuentra en muchas glicoproteínas y mucinas.

Las estructuras “core” 2 contienen una ramificación GlcNAc unida a una estructura “core” 1 (Gal β 1-3[GalNAc β 1-6]GalNAc α 1-Ser/Thr) (Figura 3), y al igual que sucede con los glicanos “core” 1, los “core 2” también se encuentran en muchas glicoproteínas y mucinas.

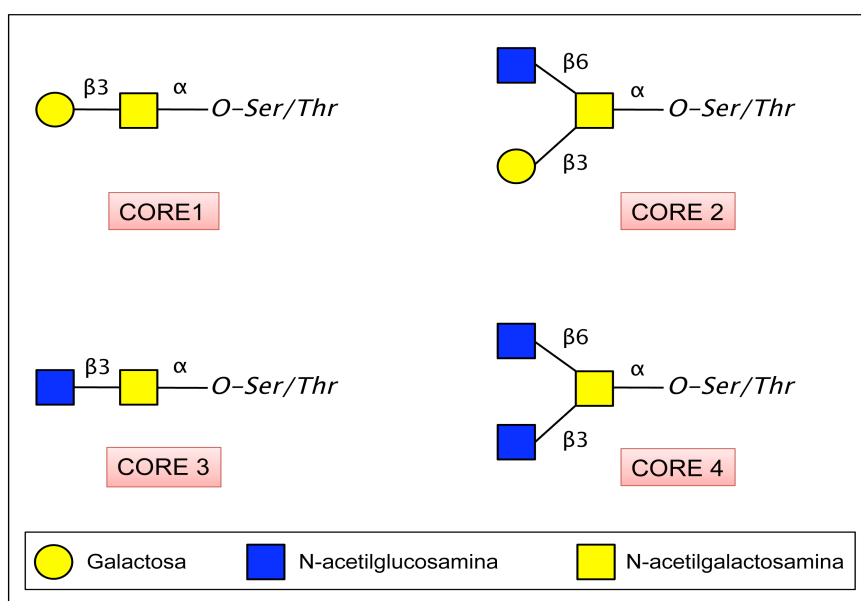
El glicano GalNAc-O-Ser/Thr “core” 3 tiene una estructura lineal (GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr), mientras que los O-glicanos “core” 4 tienen una estructura ramificada consistente en GlcNAc β 1-3[GlcNAc β 1-6]GalNAc α 1-Ser/Thr (Figura 3). Estos dos tipos de O-glicanos se encuentran en mucinas secretadas procedentes de bronquios, colon y glándulas salivares. Las mucinas que contienen estructuras “core” 5 (GalNAc β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr) se han encontrado en el meconio y en el tejido de adenocarcinoma intestinal, mientras que las mucinas con estructuras “core” 6 (GlcNAc β 1-6GalNAc α 1-Ser/Thr) se han encontrado en el intestino y en quistes ováricos. La mucina bovina submaxilar contiene estructuras “core” 7 (GlcNAc α 1-6GalNAc α 1-Ser/Thr), y las mucinas de la vías aéreas contienen O-glicanos “core” 8 (Gal α 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr) (Tabak, 1995, Van Klinken et al., 1995).

Las estructuras “core” 1-4 y 6 pueden ser modificadas mediante extensión o ramificación, y pueden contener como residuos terminales fucosa o ácido siálico. Entre las modificaciones de estos O-glicanos se encuentra la adición de unidades de N-acetilactosamina (LacNAc) (Gal β 1-4GlcNAc) o de determinantes antigénicos como los antígenos de los grupos sanguíneos A (GalNAc α 1-3[Fuc α 1-2]-Gal), B (Gal α 1-3[Fuc α 1-2]-Gal) y H (Fuc α 1-3-Gal).

Tabla 1. Tipos de O-glicanos en humanos

Tipo de O-glicano	Estructura y enlace peptídico	Glicoproteínas
Mucina	(R)-GalNAc α 1-Ser/Thr	Glicoproteínas secretadas y de membrana plasmática
GAG	(R)-GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl β 1-Ser	Proteoglicanos
O-GlcNAc	GlcNAc β 1-Ser/Thr	Glicoproteínas nucleares y citoplasmáticas
O-Gal	Glc α 1-2 \pm Gal β -O-Lys	Colágenos
O-Man	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-Ser/Thr	α -dístroglicano
O-Glc	Xyl α 1-3Xyl α 1-3 \pm Glc β 1-Ser	Proteínas con dominios EGF
O-Fuc	NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3 \pm Fuc α 1-Ser/Thr Glc β 1-3Fuc α 1-Ser/Thr	Proteínas con dominios EGF Repeticiones TSR

GAG-glicosaminoglicanos; GalNAc (N-acetilgalactosamina), Gal (galactosa), GlcNAc (N-acetilglucosamina), Man (Manosa), Glc (glucosa), Xyl (xilosa), Fuc (fucosa), NeuAc (ácido siálico), GlcA (ácido glucurónico), R representa azúcares como Gal, GlcNAc, Fuc o NeuAc.

**Figura 3.** Representación esquemática de las principales estructuras “core” de los O-glicanos de tipo mucina (GalNAc-O-Ser/Thr).

3.2.2. O-manosilglicanos

La O-manosilación fue identificada y caracterizada por primera vez en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) donde las glicoproteínas O-manosiladas son componentes abundantes de la pared celular y son indispensables para el mantenimiento de la integridad de la célula (Sentandreu and Northcote, 1968). En mamíferos, los O-manosilglicanos se identificaron por primera vez en un extracto de proteoglicanos de cerebro de rata, y se estima que aproximadamente el 30% de los O-glicanos de cerebro

contienen manosa como residuo inicial de la cadena (Finne et al., 1979). Una de las estructuras “core” identificadas correspondía al O-manosilglicano Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Man-O-Ser/Thr, pudiendo contener asimismo fucosa, ácido siálico y/o sulfato.

Durante más de diez años, estas estructuras se consideraron glicanos raros, exclusivos de proteoglicanos cerebrales, hasta que en el año 1997, el O-manosilglicano NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-O-Ser/Thr se identificó en el α -DG purificado a partir de nervio periférico bovino (Chiba et al., 1997), y posteriormente procedente de músculo de conejo (Sasaki et al., 1998) (Figura 4). En el α -DG de músculo de conejo, además de este O-manosilglicano, se encontraron O-glicanos de tipo mucina con estructura “core” 1 (Gal β 1-3GalNAc). El tetrasacárido NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-Ser/Thr representa el componente mayoritario del α -DG, constituyendo aproximadamente el 66% de los O-glicanos sialilados presentes en el dominio de tipo mucina, y su presencia es esencial para la unión a la laminina. Se han descrito otras variantes estructurales de este tetrasacárido que contienen estructuras de tipo Lewis (Gal β 1-4[Fuc α 1-3]GlcNAc-R) (Smalheiser et al., 1998), epítomos HNK-1 (HSO₃-3GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man) (Yuen et al., 1997) y O-manosilglicanos ramificados (Chai et al., 1999) (Figura 4).

Un estudio glicoproteómico del α -DG de músculo esquelético humano reveló la presencia de 25 glicopéptidos que correspondían a cinco péptidos trípticos del dominio de tipo mucina del α -DG. Cuatro de los péptidos presentaban una gran heterogeneidad de O-glicanos de tipo mucina, mientras que el otro péptido presentaba exclusivamente O-manosilglicanos de tipo LacNAc-Man-Ser/Thr, con o sin residuos de ácido siálico (Nilsson et al., 2010). En cambio, para el α -DG de músculo esquelético de conejo se caracterizaron 91 glicopéptidos y se identificaron 9 sitios de O-manosilación y 14 sitios que presentaban uniones O-GalNAc (Stalnakier et al., 2010).

La caracterización glicoproteómica del α -DG de distintas líneas celulares se ha realizado mediante transfección de construcciones etiquetadas con distintos epítomos y posterior purificación del α -DG recombinante (Kunz et al., 2004, Harrison et al., 2012). De esta manera, la purificación de α -DG recombinante de conejo, purificado a partir de células HEK293T, ha permitido identificar por primera vez un O-manosilglicano fosforilado (Yoshida-Moriguchi et al., 2010) (Figura 4). El análisis glicoproteómico de extractos de cerebro de ratón “knock out” (KO) condicional de *Dag1*, y por lo tanto carente de distroglicano, evidenció la presencia de O-manosilglicanos con estructura

similar a los ratones silvestres, lo que sugiere la presencia de otras proteínas O-manosiladas, además del α -DG, en el cerebro de mamíferos (Stalnaker et al., 2011). Se ha demostrado que no existe una secuencia consenso de O-manosilación, pero este tipo de modificación depende estrictamente de una región peptídica p377-417, localizada delante del dominio de tipo mucina (Breloy et al., 2008).

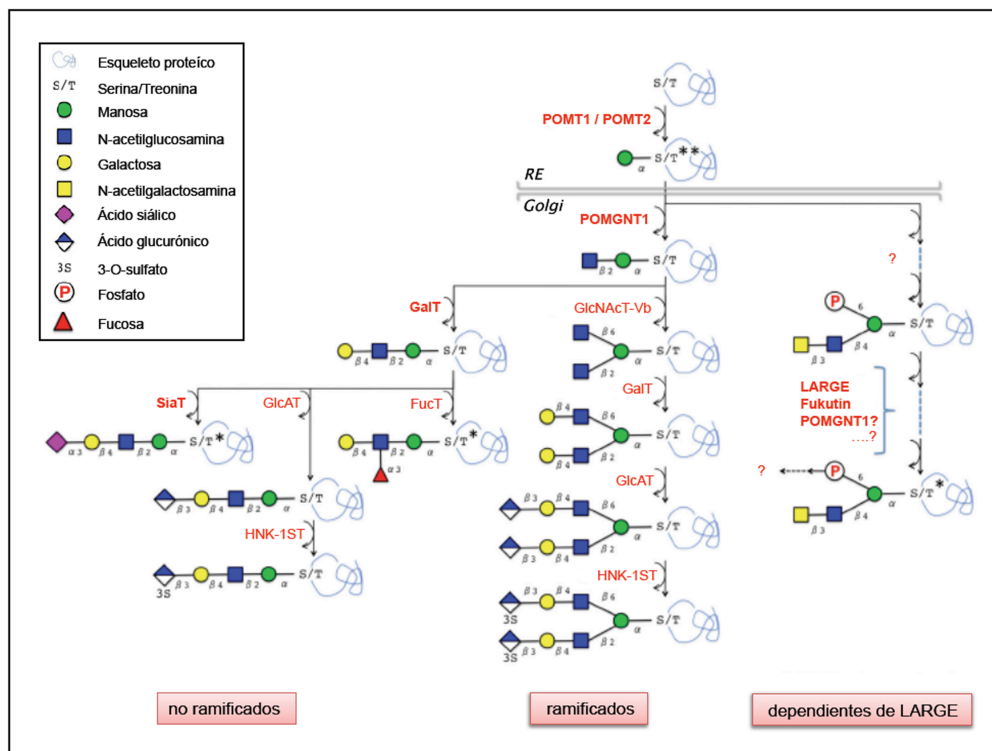


Figura 4. Estructuras y biosíntesis de los O-manosilglicanos en animales. Las flechas indican las etapas enzimáticas catalizadas por las enzimas: POMT1/POMT2, proteínas O-manosiltransferasas 1 y 2; POMGNT1, proteína O-manosa β 1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa 1; GlcNAcT-Vb (Gnt-IX, Mgat-5b), β 1,6-N-acetilglucosaminiltransferasa; GalT, β 1,4-galactosiltransferasa; SIAT, α 2,3-sialiltransferasa; FucT, α 1,3-fucosiltransferasa; GlcAT, β 1,3-glucuroniltransferasa; HNK-1ST, sulfotransferasa de carbohidratos. *Estructuras identificadas en el α -dístroglicano de mamíferos. **Estructuras identificadas en el dístroglicano de *Drosophila*. ?: etapas/enzimas desconocidas.

4. Defectos en la O-glicosilación del α -dístroglicano. Dístroglicanopatías

Las distrofias musculares congénitas son enfermedades musculares muy heterogéneas clínica y genéticamente, con manifestación temprana o tardía, y en las cuales el análisis histológico de la biopsia muscular indica una miopatía distrófica (Lisi and Cohn, 2007). Dentro de este grupo se incluyen las distrofias musculares asociadas con hipoglicosilación del α -DG denominadas dístroglicanopatías y que cursan también con diversas patologías del sistema nervioso central y ocular.

Las distroglicanopatías presentan un rango muy amplio de manifestaciones clínicas que varían desde patologías muy severas como el Síndrome de Walker-Warburg (WWS [OMIM 236670]), la enfermedad músculo-ojo-cerebro (MEB [OMIM 253280]) y la distrofia muscular congénita de tipo Fukuyama (FCMD [OMIM 253800]), hasta patologías leves con manifestación tardía, como la distrofia de cinturas 2I (LGMD2I, [OMIM 607155]) sin afectación cerebral y ocular. Entre los dos extremos se sitúan otras patologías de severidad intermedia como las distrofias musculares congénitas 1C (MDC1C [OMIM 606612]) y 1D (MDC1D [OMIM 608840]). Además, se han descrito otras variantes de distrofias de cinturas causadas por hipoglicosilación del α -DG como LGMD2K, 2M, 2N y 2O (Muntoni et al., 2008).

4.1. Síndrome de Walker-Warburg

El síndrome de Walker-Warburg (WWS) representa la más grave de las distroglicanopatías y se caracteriza por anomalías complejas del sistema nervioso central (agiria, hidrocefalia, anomalías de la fosa posterior), alteraciones oculares y distrofia muscular congénita (Tabla 2). Esta patología rara fue descrita por primera vez por Walker en 1942. Posteriormente Warburg revisó 15 casos publicados con patología cerebral y ocular postulando el modo de herencia autosómica recesiva (Warburg, 1978). La enfermedad tiene una incidencia especialmente baja (1/60.000 nacimientos), y los pacientes tienen una esperanza de vida inferior a los 3 años (la media es de 0,8 años).

El primer gen que se describió como causante de WWS fue el gen *POMT1* (proteína *O*-manosiltransferasa 1) (Beltran-Valero de Bernabe et al., 2002). Sin embargo, el análisis mutacional de los pacientes WWS reveló que sólo el 20% de los casos presentaban mutaciones en este gen, poniendo de manifiesto la heterogeneidad genética de esta patología (Vajsar and Schachter, 2006). Posteriormente se encontraron mutaciones en otros genes como *fukutina* (*FKTN*) (Silan et al., 2003, de Bernabe et al., 2003, Godfrey et al., 2007, Cotarelo et al., 2008), *fukutin related protein* (*FKRP*) (Beltran-Valero de Bernabe et al., 2004), *proteína O*-manosiltransferasa 2 (*POMT2*) (van Reeuwijk et al., 2005) y *LARGE* (van Reeuwijk et al., 2007). Sin embargo, existe un porcentaje elevado de casos de WWS, aproximadamente el 60%, en los que se desconoce el gen causante. Así mismo, se han descrito mutaciones en *POMT1* en otras distroglicanopatías como MEB, distrofia muscular congénita con retraso mental (CMD-MR) e incluso en pacientes con distrofia de cinturas con retraso mental (LGMD2K) (Godfrey et al., 2007).

4.1.1. Proteínas O-manosiltransferasas

En levaduras, las proteínas O-manosiltransferasas están representadas por tres subfamilias de enzimas: PMT1, PMT2 y PMT4. En mamíferos se han descrito sólo dos proteínas O-manosiltransferasas: POMT1 y POMT2, las cuales tienen similitud con las enzimas PMT4 y PMT2, respectivamente. Al igual que las PMTs de levaduras, las proteínas POMT1 y POMT2 se localizan en el retículo endoplásmico y catalizan el paso inicial de la biosíntesis de los O-manosilglicanos, consistente en la transferencia de residuos de manosa sobre serinas y treoninas de las proteínas diana que entrarían en el la vía de secreción, utilizando como sustrato dolicol-fosfato manosa (Dol-P-Man). Se ha demostrado que la coexpresión de POMT1 y POMT2 es un requisito imprescindible para la actividad manosiltransferasas, lo que indica la formación de un heterocomplejo (Manya et al., 2004). Esta hipótesis está reforzada por la coimmunoprecipitación de estas dos proteínas y su colocación en el retículo endoplásmico (Akasaka-Manya et al., 2006). No obstante lo dicho, un estudio reciente utilizando construcciones mutantes de POMT1 y POMT2, demostró funciones no equivalentes para las dos proteínas, ya que la sustitución de varios aminoácidos clave para la actividad enzimática tenía efectos distintos sobre la actividad manosiltransferasa de las dos proteínas (Akasaka-Manya et al., 2011). Mediante el uso de algoritmos se han generado modelos de estructura secundaria para POMT1 y POMT2, y se han detectado posibles sitios de N-glicosilación sobre las mismas, demostrándose el requerimiento de este tipo de modificación postraducciona para la correcta actividad del complejo POMT1-POMT2 (Manya et al., 2010).

4.2. Enfermedad músculo-ojo-cerebro

La enfermedad músculo-ojo-cerebro (MEB) está considerada la segunda en gravedad después de WWS, ya que sus características clínicas son muy parecidas a las de WWS. Sin embargo, la esperanza de vida de los pacientes MEB es más elevada, entre 10 y 30 años. Es una enfermedad con herencia autosómica recesiva caracterizada por distrofia muscular congénita, retraso mental grave, alteraciones oculares y defectos en la migración neuronal de tipo paquigiria-polimicrogria (Tabla 2).

MEB fue descrito por primera vez en pacientes finlandeses por Santavuori en el año 1977, y hasta el año 1999, cuando se posicionó el gen responsable en el cromosoma 1p32-34 (Cormand et al., 1999), se habían descrito 30 pacientes MEB en Finlandia (Raitta et al., 1978, Santavuori et al., 1989, Pihko et al., 1995) y 10 pacientes fuera de

este país (Korinthenberg et al., 1984, Echenne et al., 1986, Federico et al., 1988, Leyten et al., 1992, Topaloglu et al., 1995, van der Knaap et al., 1997). La alta incidencia de esta enfermedad en Finlandia (1/50.000) se debe a una mutación fundadora en el intrón 17 del gen *POMGNT1* (c.1539+1G>A) y al alto grado de endogamia de esta población (Norio, 2003). Posteriormente, la mutación fundadora finlandesa se describió en pacientes MEB de Bélgica, Suecia, Noruega, Estonia y Norteamérica (Taniguchi et al., 2003, Diesen et al., 2004, Hehr et al., 2007). La identificación de nuevos pacientes MEB con mutaciones en *POMGNT1* ha permitido la ampliación del espectro fenotípico de la enfermedad y la confirmación de este gen como su principal causante (Hehr et al., 2007, Godfrey et al., 2007). Así mismo, mutaciones en *POMGNT1* se identificaron ocasionalmente en pacientes con formas graves de FCMD (Taniguchi et al., 2003), con formas leves de WWS (Taniguchi et al., 2003, Mercuri et al., 2009), en pacientes con distrofia muscular congénita (CMD) (Mercuri et al., 2009, Biancheri et al., 2006, Oliveira et al., 2008) y en pacientes con distrofia de cinturas (LGMD2O) (Clement et al., 2008b, Raducu et al., 2012). Otros estudios describieron pacientes MEB con mutaciones en los genes *POMT1*, *POMT2*, *FKRP* y *LARGE* (Mercuri et al., 2009, Clement et al., 2008a), evidenciando de esta manera una cierta heterogeneidad genotipo-fenotipo dentro de este tipo de distroglicanopatías.

4.2.1. Proteína O-manosa β 1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa 1

La identificación y caracterización funcional de una nueva enzima denominada POMGNT1 (UDP-N-acetilglucosamina : O-manosa β -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa) procedente de una fracción microsomal de cerebro de rata (Takahashi et al., 2001), que cataliza la transferencia de GlcNAc a residuos de O-manosa de las glicoproteínas, permitió su clonación y posterior identificación como causa genética de MEB (Yoshida et al., 2001). Una vez demostrado que los O-manosilglicanos sialilados de tipo NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-O-Ser/Thr representaban el nexo de unión del α -DG a la laminina, y tras la identificación de POMGNT1 como enzima implicada en la síntesis de estos glicanos, se reportó que la deficiencia de glicosilación del α -DG representaba un nuevo mecanismo patológico de las distrofias musculares con afectación cerebral denominadas distroglicanopatías. POMGNT1 tiene una estructura típica de glicosiltransferasas residentes del aparato de Golgi (proteínas de membrana con topología tipo II) y su secuencia peptídica, con una longitud de 660 aminoácidos, tiene homología con la enzima N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI) que participa

en la formación de las uniones Glc β 1-2Man en las etapas tempranas del procesamiento de los N-glicanos. En base a la estructura de la GnTI, se ha establecido la siguiente organización por dominios para POMGNT1: una cola N-terminal citoplásmica (Met1-Arg37), un dominio transmembrana (Phe38-Ile58), un dominio tallo (“stem”) (Leu59-Leu300) y un dominio catalítico, que presenta alta homología con el dominio catalítico de GnTI, y subdividido a su vez en una región de unión de UDP-GlcNAc y Mn²⁺ (Asn301-Leu530) y una región específica aceptora implicada en el reconocimiento del sustrato (Arg531-Thr660) (Figura 44, apartado “Discusión”) (Akasaka-Many et al., 2004). Aunque la identidad general de secuencia entre POMGNT1 y GnTI es de sólo el 23,2%, existe una alta homología entre los dominios catalíticos de las dos enzimas, lo que sugiere un mecanismo de acción similar. Las dos enzimas catalizan la formación de uniones GlcNAc β 1-2Man, pero en rutas distintas de glicosilación, sin que se conozca el motivo de esta especificidad. Para el diagnóstico de los posibles pacientes con MEB y otras CMD causadas por mutaciones en *POMGNT1* se puede emplear un test de medida de actividad enzimática de esta proteína, utilizando biopsia muscular congelada o líneas celulares de fibroblastos o linfoblastos inmortalizados, lo que permitiría realizar una correlación genotipo-fenotipo en estos pacientes (Zhang et al., 2003, Many et al., 2008). *POMGNT1* tiene una expresión ubicua, su ARNm es de 2,7 Kb y el tamaño molecular predicho para la proteína es de 75 kDa (Yoshida et al., 2001).

En cuanto a modelos animales KO para el gen *POMGNT1*, se han descrito dos ratones KO que se generaron empleando metodologías distintas y en los cuales los fenotipos resultantes eran también diferentes. El primer modelo se generó mediante inserción de un casete “gene-trapping” en el exón dos, y el ratón presentaba un conjunto de alteraciones musculares, cerebrales y oculares semejantes a los pacientes MEB (Liu et al., 2006). El segundo modelo de ratón KO se generó mediante disrupción del exón 18, y presentaba un fenotipo muscular mucho más leve y una esperanza de vida mucho más corta comparado con el primer modelo (Miyagoe-Suzuki et al., 2009). Se ha descrito una posible interacción entre POMGNT1 y FKTN mediada por la región transmembrana de la FKTN, demostrándose un bajada en la actividad enzimática de POMGNT1 en ausencia de FKTN (Xiong et al., 2006). En vista de estos datos se ha postulado que defectos en FKTN podrían afectar a la correcta glicosilación del α -DG debido a alteraciones en la actividad enzimática de POMGNT1. Sin embargo, la generación de los modelos animales de ratón KO para *FKTN* y *POMGNT1* desmintieron dicha hipótesis, ya que el ratón KO de *FKTN* es letal embrionario

(Kurahashi et al., 2005), mientras que el ratón KO de *POMGNT1* es viable, sugiriendo una interacción adicional de FKTN con otras proteínas. Existe un único ortólogo de POMGNT1 en vertebrados, mientras que en invertebrados como *Drosophila* no se ha descrito un equivalente funcional de esta proteína, lo que justifica la presencia de cadenas de O-manosa no elongadas en el distroglicano de *Drosophila* (Nakamura et al., 2010a, Nakamura et al., 2010b).

4.3. Distrofia muscular congénita tipo Fukuyama

La distrofia muscular congénita tipo Fukuyama (FCMD) es la segunda distrofia muscular infantil en Japón (con una incidencia de 1/34.000) y también una de las enfermedades autosómicas recesivas más frecuentes en este país. Fue descrita por primera vez por el neuropediatra Fukuyama en el año 1960 y presenta afectaciones musculares y cerebrales similares a los otros dos síndromes graves WWS y MEB, pero con una esperanza de vida similar a MEB, de entre 10-20 años. Clínicamente, FCMD se distingue de WWS y MEB en base al grado de afectación ocular, ya que en muchos pacientes con FCMD la afectación ocular no es constante y en algunos casos se reduce a miopía sin alteraciones estructurales. Esta causada principalmente por mutaciones en el gen *FKTN* y la mayoría de los pacientes con FCMD se han descrito en Japón debido a la presencia de una mutación fundadora en esta población consistente en la inserción de un retrotransposón tipo SVA (SINE-VNTR-Alu) de 3 Kb en el extremo 3'-UTR (Toda and Kobayashi, 1999). Esta inserción provoca un descenso en los niveles del ARNm de *FKTN* y el fenotipo que genera cuando está en homocigosis es más leve que cuando se encuentra en heterocigosis con una mutación en la propia región codificante. Sin embargo, cuando las dos mutaciones se encuentran en la región codificante, el fenotipo es mucho más grave, similar a WWS (Silan et al., 2003, de Bernabe et al., 2003, Cotarelo et al., 2008), e incluso se postuló que podría ser letal embrionario (Kondo-Iida et al., 1999). Un estudio reciente ha revelado que la base molecular de FCMD consiste en un procesamiento ("splicing") aberrante del ARNm de *FKTN* causado por la inserción del retrotransposón (Taniguchi-Ikeda et al., 2011). Dicha inserción genera un evento de "splicing" entre un sitio aceptor presente en el retrotransposón y un sitio donador de "splicing" presente en el exón 10. La proteína predicha pierde 38 aminoácidos correspondientes al dominio C-terminal silvestre y adquiere 129 aminoácidos derivados de la inserción del retrotransposón. Este proceso impide la localización correcta de la FKTN mutante en el aparato de Golgi, sugiriendo un papel

importante del dominio C-terminal en la localización celular de la proteína. Los mismos autores proponen una terapia de modulación de “splicing” mediante el uso de oligonucleótidos antisentido, no sólo para el tratamiento de los pacientes con FCMD, sino también para otras enfermedades causadas por inserciones de retrotransposones como la hipercolesterolemia autosómica recesiva (ARH) y la miopatía por almacenamiento de lípidos neutros (NLSDM).

4.3.1. Fukutina

En gen *fukutina* (*FKTN*) está localizado en el cromosoma 9q31 y codifica una proteína de membrana de tipo II con una secuencia peptídica de 461 aminoácidos y un peso molecular predicho de 53,7 kDa (Toda et al., 2005). Se expresa de forma ubicua, con una expresión elevada en músculo esquelético, corazón y cerebro (Hayashi et al., 2001). La función de *FKTN* es aún desconocida. Estructuralmente posee un único dominio transmembrana (6-26 aa) implicado en su localización en el aparato de Golgi y un dominio LicD (PfamPF04991) (288-327 aa) implicado en el metabolismo de la fosforilcolina y de algunos lipopolisacáridos en bacterias (Figura 45, apartado “Discusión”). El dominio LicD contiene un motivo DxD (Asp-aa-Asp) (317-319 aa) característico de glicosiltransferasas, lo que sugirió un posible papel de glicosiltransferasa para *FKTN* (Aravind and Koonin, 1999). Sin embargo, todos los ensayos realizados hasta la fecha para detectar una posible actividad enzimática relacionada con la O-manosilación del α -DG no han tenido resultados positivos. Dichos ensayos consistían en la medida de la actividad de transferencia de distintos azúcares empleando fracciones microsomales preparadas a partir de células que sobre-expresaban *FKTN* (Xiong et al., 2006). *FKTN* posee homología de estructura secundaria con la proteína MNN4 de levaduras que participa en la síntesis de N- y O-glicanos mediante adición de residuos de manosilfosfato utilizando como donador GDP-Man. Todos estos datos apuntan hacia un papel de *FKTN* como proteína que modifica moléculas de superficie celular, probablemente mediante adición de fosforilazúcares. Se ha postulado una posible interacción entre *FKTN* y α -DG tanto en cerebro como en músculo esquelético. Dicha interacción parece realizarse tanto en el caso del α -DG glicosilado como hipoglicosilado, lo que sugiere una interacción por la parte del “core” del distroglicano y no mediante los residuos glicosílicos (Yamamoto et al., 2006).

4.4. Distrofias de cinturas causadas por hipoglicosilación del α -dístroglicano

Las distrofias de cinturas (LGMD) son un grupo muy heterogéneo de distrofias musculares que afectan principalmente a la cintura pélvica y escapular y se clasifican en distrofias de cinturas con herencia autosómica dominante (AD-LGMD o LGMD1) y distrofias de cinturas con herencia autosómica recesiva (AR-LGMD o LGMD2). Las formas autosómicas recesivas son las más frecuentes y se han descrito actualmente 14 tipos. En los últimos años, el espectro fenotípico de las enfermedades causadas por hipoglicosilación del α -DG se ha extendido hasta incluir variantes leves de LGMD sin afectación cerebral y ocular (Tabla 2).

4.4.1. Distrofia de cinturas tipo 2I

Las distrofias de cinturas 2I (LGMD2I) se caracterizaron molecularmente en el año 2001 y están causadas por mutaciones en el gen *FKRP* (Brockington et al., 2001b). El gen *FKRP* se identificó por homología de su secuencia peptídica con *FKTN* y otras glicosiltransferasas bacterianas, y se localizó en humanos en el cromosoma 19q13.3 (Brockington et al., 2001a). Se ha postulado que las mutaciones que afectan a la translocación de FKRP del retículo endoplásmico al aparato de Golgi dan lugar de manera invariable a fenotipos graves, mientras que las mutaciones que no afectan la correcta localización de la proteína dan lugar a fenotipos leves (Esapa et al., 2005). LGMD2I es la forma más común de LGMD en Dinamarca, el norte de Inglaterra y América del Norte, siendo la mutación más frecuente en todos ellos p.Leu276Ile, en forma homocigota (Sveen et al., 2006). El fenotipo asociado con esta mutación es muy leve, mientras que los pacientes heterocigotos compuestos presentan fenotipos más graves (Keramaris-Vrantsis et al., 2007). El espectro fenotípico de las LGMD2I se ha ampliado, ya que se ha descrito un paciente con miocardiopatía dilatada y sin debilidad muscular. Por ello, en los pacientes LGMD2I se recomienda un seguimiento clínico de la función cardíaca (D'Amico et al., 2008).

4.4.2. Distrofia de cinturas tipo 2K

La ausencia de alteraciones estructurales cerebrales y oculares, junto con la leve afectación muscular en aquellos pacientes que presentaban mutaciones en el gen *POMT1*, condujo a la descripción de un nuevo fenotipo denominado LGMD2K. La aparición temprana de esta patología junto con el retraso mental presente en estos

pacientes dificulta la distinción entre CMDs y LGMDs. (Tabla 2) (Balci et al., 2005, D'Amico et al., 2006, Godfrey et al., 2007).

4.4.3. Distrofia de cinturas tipo 2M

Las distrofias de cinturas 2M (LGMD2M) están causadas por mutaciones en el gen *FKTN* y hasta el momento se han descrito tres pacientes con LGMD2M sin afectaciones estructurales y funcionales del cerebro y con respuesta clínica positiva al tratamiento con esteroides (Godfrey et al., 2007).

4.4.4. Distrofia de cinturas tipo 2N

Hasta la fecha se han descrito dos pacientes con distrofia de cinturas que llevan mutaciones en el gen *POMT2* y que se ha denominado LGMD2N. Uno de los pacientes presentaba cambios miopáticos en la biopsia muscular y con nivel de inteligencia normal (Biancheri et al., 2007), mientras que el segundo tenía un fenotipo similar pero con retraso mental (Godfrey et al., 2007).

4.4.5. Distrofia de cinturas tipo 2O

Las mutaciones en el gen *POMGNT1* son causantes principalmente de MEB. Sin embargo, el espectro fenotípico de las patologías asociadas a mutaciones en este gen se amplió con la descripción de un caso de LGMD sin afectación cerebral, que se denominó fenotipo LGMD2O (Clement et al., 2008b). Un segundo paciente con LGMD2O fue descrito por nuestro grupo y su completa caracterización se detalla en esta tesis doctoral.

Tabla 2. Tipos de distroglicanopatías, mutaciones asociadas y características clínicas.

Tipo	Gen	Afectación muscular	Sistema nervioso
WWS	<i>POMT1</i> <i>POMT2</i> <i>POMGNT1</i> <i>FKTN</i> <i>FKRP</i> <i>LARGE</i>	Movilidad muy reducida, debilidad muscular, patrón distrófico en biopsia muscular, niveles séricos de CK elevados, hipoglicosilación del α -DG.	Malformaciones cerebrales graves: encefalocele, hidrocefalia, lisencefalia tipo II/agiria, agenesia del cuerpo calloso, fusión de los hemisferios cerebrales, atrofia del vermis cerebeloso. Malformaciones oculares: microftalmia uni o bilateral, buftalmos, hipoplasia o ausencia del nervio óptico, desprendimiento de retina, malformaciones de la cámara anterior (cataratas, malformación del iris y glaucoma).
MEB	<i>POMGNT1</i> <i>POMT1</i> <i>POMT2</i> <i>FKRP</i> <i>LARGE</i>	Movilidad reducida, hipotonía muscular grave, capacidad de sentarse sin ayuda, pueden hablar pocas palabras, degeneración muscular, fibrosis, niveles séricos de CK elevados, hipoglicosilación del α -DG.	Malformaciones cerebrales menos graves que WWS: hipoplasia cerebelar, displasia cortical, paquigiria/polimicrogiria, ataques epilépticos frecuentes, adelgazamiento del tronco cerebral. Malformaciones oculares: miopía acentuada, displasia de retina o atrofia progresiva de retina, desprendimiento de retina, cataratas, glaucoma. En algunos casos se pueden observar manifestaciones autistas.
FCMD	<i>FKTN</i>	Hipotonía muscular grave, movilidad reducida, miocardiopatía dilatada, alargamiento de los gemelos, cuádriceps y de la lengua, escoliosis, niveles séricos de CK elevados, hipoglicosilación del α -DG.	Malformaciones cerebrales menos graves que WWS: polimicrogiria, hipoplasia cerebelar, displasia cortical, adelgazamiento del tronco cerebral. Malformaciones oculares: en muy pocos casos desprendimiento de retina.
MDC1C	<i>FKRP</i>	Debilidad muscular, hipotonía, movilidad limitada, afectación cardíaca (ventrículo izquierdo), hipotrofia muscular, niveles séricos de CK elevados, hipoglicosilación del α -DG.	Retraso mental, cambios estructurales leves del cerebelo, quistes cerebelares, miopía, pigmentación retiniana anormal.
MDC1D	<i>LARGE</i>	Debilidad muscular, espasticidad muscular, hipertrofia muscular, niveles séricos de CK elevados, hipoglicosilación del α -DG.	Retraso mental severo, cambios en la sustancia blanca, migración neuronal anormal.
LGMD2I	<i>FKRP</i>	No hay pérdida de la ambulación, dificultad para subir escaleras, calambres, hipertrofia de gemelos, escoliosis, lordosis, miocardiopatía dilatada, patrón muscular distrófico, aumento de los niveles de CK, hipoglicosilación del α -DG.	No cursa con afectación del sistema nervioso o retraso mental.
LGMD2K	<i>POMT1</i>	Debilidad muscular, hipertrofia muscular, niveles séricos de CK elevados, hipoglicosilación del α -DG.	Retraso mental leve, microcefalia, sin anomalías estructurales en ojo y cerebro.
LGMD2M	<i>FKTN</i>	Debilidad muscular, hipertrofia muscular, niveles séricos de CK elevados, hipoglicosilación del α -DG, buena respuesta al tratamiento con esteroides.	No cursa con afectación del sistema nervioso o retraso mental.
LGMD2N	<i>POMT2</i>	Debilidad muscular, hipertrofia muscular, lordosis, niveles séricos de CK elevados, hipoglicosilación del α -DG.	Con o sin retraso mental y sin afectación ocular.
LGMD2O	<i>POMGNT1</i>	Hipotonía, retraso en el desarrollo motor, debilidad muscular proximal, niveles séricos de CK elevados, hipoglicosilación del α -DG, buena respuesta al tratamiento con esteroides	No cursa con afectación del sistema nervioso o retraso mental.

4.5 Nuevos genes causantes de distroglicanopatías

4.5.1. Dolicol quinasa

La dolicol quinasa (DOLK) es una enzima residente en el retículo endoplásmico que participa en la biosíntesis del dolicol monofosfato (Dol-P), y cataliza la fosforilación mediada por CTP del dolicol. El Dol-P es un lípido portador de azúcares esencial para la C- y O-manosilación, N-glicosilación y la síntesis de glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Recientemente se han identificado mutaciones en el gen *DOLK* en 11 pacientes con miocardiopatía dilatada no sindrómica y déficit congénito de glicosilación (CDG), sin ningún tipo de afectación muscular u ocular (Lefeber et al., 2011). Ya que la miocardiopatía dilatada no es una característica común en los pacientes con CDG, los análisis bioquímicos revelaron una deficiencia en la O-manosilación del α -DG en el tejido cardíaco de los pacientes, sugiriendo un nuevo mecanismo patológico de las miocardiopatías dilatadas no sindrómicas asociadas a CDGs.

4.5.2. Dolicol fosfato-manosa sintasa

La enzima dolicol fosfato-manosa (DPM) sintasa juega un papel importante en cuatro rutas distintas de glicosilación: N-glicosilación, C-manosilación, O-manosilación y en la biosíntesis del glicosilfosfatidilinositol (GPI). En eucariotas superiores el complejo DPM sintasa esta compuesto por tres subunidades. La subunidad catalítica DPM1 está localizada en el citoplasma y cataliza la síntesis del Dol-P-Man (Dolicol fosfato-manosa) mediante transferencia de residuos de manosa desde GDP-Man, a Dol-P. La subunidad 2 (DPM2) tiene un papel estabilizador del complejo y está embebida en la membrana del retículo endoplásmico al igual que la subunidad 3 (DPM3). En el año 2009 se describió un paciente con CDG asociado con distrofia muscular leve, miocardiopatía, sin afectaciones cerebrales y oculares, y que presentaba hipoglicosilación del α -DG. El análisis mutacional reveló una mutación en la subunidad DPM3 (Lefeber et al., 2009). Recientemente se han descrito dos hermanos con distrofia muscular, retraso mental severo, microcefalia e hipoplasia cerebelar debido a mutaciones en la subunidad DPM2 (Messina et al., 2009).

4.5.3. Distroglicano

Hasta hace muy poco tiempo no se había descrito ningún paciente con mutaciones en el gen que codifica el distroglicano (*DAG1*), lo que apuntaba una

letalidad embrionaria de estas mutaciones. Esta hipótesis estaba reforzada por la letalidad embrionaria del ratón KO de *Dag1* por problemas en la formación de la membrana de Reichert (Williamson et al., 1997), al igual que ocurría con el ratón KO de *Pomt1* (Willer et al., 2004). Recientemente se ha descrito el único paciente con distroglicanopatía, concretamente con LGMD y retraso mental, que presentaba una mutación (p.Tyr192Met) en homocigosis en el gen *DAG1* (Hara et al., 2011). La sustitución afecta a un residuo del dominio N-terminal del α -DG y genera una bajada en la afinidad de la glicosiltransferasa LARGE para el α -DG, dando lugar a una modificación postraduccional incompleta, y en consecuencia una baja afinidad del α -DG para la laminina.

4.5.4. Colágeno 4 alfa 1

Se han descrito dos pacientes con fenotipo WWS/MEB que presentaban mutaciones en heterocigosis en el gen que codifica la cadena $\alpha 1$ del colágeno IV (*COL4A1*). Por ello, se ha propuesto un nuevo mecanismo patológico para estas dos graves enfermedades, que no se debería a la expresión y a la modificación postraduccional del α -DG, sino a la disminución de los niveles de COL4A1 en las membranas basales (Labelle-Dumais et al., 2011). Las sustituciones afectan a residuos conservados localizados en dominios implicados en la formación de la triple hélice del colágeno y generan una acumulación en el interior celular de proteínas mal plegadas debido a la reducción de la secreción de los heterotrímeros de colágeno. Así mismo, el ratón mutante *Col4a1* heterocigoto (*Col4a1*^{+/ Δ 40}) presenta una serie de afectaciones típicas de WWS/MEB representadas por disgenesia ocular, defectos en la migración neuronal y miopatía congénita.

Objetivos

En la presente tesis se han planteado los siguientes objetivos:

1. Diagnostico molecular de pacientes con distroglicanopatía.
 - Análisis mutacional de los genes candidatos.
 - Caracterización de la región promotora del gen *POMGNT1* humano, y análisis de los mecanismos basales que regulan su transcripción.
 - Análisis funcional de una alteración detectada en la secuencia promotora del gen *POMGNT1* y su relación con las distrofias musculares de cinturas tipo 2O.
2. Purificación y caracterización glicoproteómica del α -distroglicano nativo de miotubos de ratón C2C12.
3. Estudio de la función de *FKTN* mediante glicómica comparativa.
 - Silenciamiento de la expresión de *FKTN* en la línea celular C2C12 mediante ARN de interferencia y purificación del α -distroglicano nativo hipoglicosilado.
 - Caracterización y análisis comparativo de los perfiles de glicosilación del α -distroglicano nativo hipoglicosilado y silvestre.

Materiales y Métodos

Materiales

1. Pacientes analizados. Características clínicas

1.1. Familia 1 (Paciente MEB)

Familia española procedente de Salamanca. El enfermo tiene en actualidad 12 años y es el primer hijo de padres sanos no consanguíneos. No existen antecedentes clínicos de interés en su familia. Una ecografía cerebral realizada en el tercer trimestre reveló una dilatación ventricular asociada con defectos de la línea media, lo que indicó la existencia de una malformación cerebral. El niño nació a término sin ningún tipo de complicaciones, con un peso de 2.710 g y con una puntuación en el test de Apgar de 8/9. Presentó desde el nacimiento hipotonía asociada con debilidad muscular generalizada, contracturas en rodillas, agudeza visual escasa y movimientos oculares anormales. El examen oftalmológico neonatal indicó la persistencia de la arteria hialoidea y vascularización coroidea anormal con displasia retiniana. Los niveles séricos de la creatina quinasa (CK) presentaron un aumento moderado (857 UI/L: normal <175 UI/L) y el cariotipo era normal 46 XY. La resonancia magnética nuclear (RMN) cerebral reveló la presencia de paquigiria bihemisférica de predominio frontal, ausencia parcial del cuerpo calloso, ventriculomegalia, colpocefalia e hipoplasia o adelgazamiento del tronco cerebral (Figura 5).

Durante el seguimiento, el paciente presentó un retraso global del desarrollo con debilidad axial y en las extremidades y espasticidad de miembros a la edad de 3 años. Los problemas oculares se agravaron con la presencia de glaucoma bilateral y cataratas. Se registró un gran aumento de la CK sérica, alrededor de 3.000 UI/L. A los 7 años el paciente sufrió un ataque epiléptico mientras dormía. En actualidad presenta profundas deficiencias cognitivas con ausencia total de lenguaje verbal y reacciona sólo a estímulos táctiles. También tiene tetraplejia espástica con hiperreflexia y contracturas fijas con pie equinovaro. No controla la cabeza ni tiene capacidad de sentarse sin ayuda.

Al paciente se le realizaron dos biopsias de músculo esquelético (a edades de 6 y 12 meses, respectivamente), y en ambos casos el examen histológico identificó la presencia de leves cambios miopáticos con variación en el tamaño de las fibras musculares, y de manera ocasional la presencia de fibras atroficas de tipo II (Figura 6B). La arquitectura del músculo no estaba afectada, y no se detectó fibrosis endomisial y tampoco infiltraciones de tejido graso. No se identificaron fibras necróticas o de regeneración.

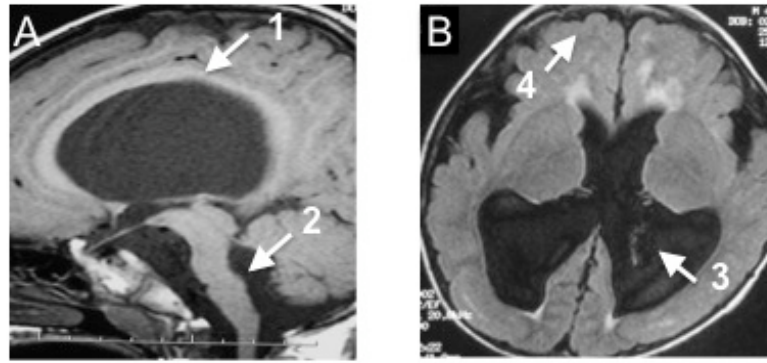


Figura 5. Resonancia magnética del paciente MEB. (A) Imagen sagital potenciada en T1 evidenciando ausencia parcial del cuerpo calloso [1] y adelgazamiento del tronco cerebral con un borde posterior cóncavo [2]. (B) Imagen de resonancia magnética axial FLAIR mostrando ventriculomegalia [3] y paquigiria bihemisférica de predominio frontal [4].

1.2. Familia 2 (Paciente LGMD2O)

Familia procedente de Bélgica sin antecedentes clínicos y padres sanos no consanguíneos. El paciente nació después de 42 semanas de gestación con un peso de 3.490 g y una longitud de 52 cm. Las habilidades cognitivas se adquirieron a edad normal pero sufrió un retraso en el desarrollo motor inicial, ya que a la edad de 9 meses presentaba capacidad de sentarse sin ayuda, pero no podía mantenerse sentado. El paciente era hipotónico, y a la edad de dos años empezó a caerse con frecuencia y no tenía mucha estabilidad en bipedestación. El examen clínico realizado a la edad de 3 años y medio, reveló debilidad muscular, leve amiotrofia generalizada y signo de Gowers. El nivel sérico de la CK fue de 283 UI/L (normal <175 UI/L).

La resonancia magnética del sistema musculoesquelético indicó anomalías de forma bilateral en los siguientes músculos: glúteo mayor (m. gluteus maximus), glúteo mediano (m. gluteus medius), glúteo menor (m. gluteus minimus), obturador (m. obturatorius), pectíneo (m. pectineus), aductor corto del muslo (m. adductor brevis), bíceps femoral (m. biceps femoris), semimembranoso (m. semimembranosus), aductor mayor del muslo (m. adductor magnus), aductor largo del muslo (m. adductor longus), así como: tensor de la fascia lata (m. tensor fasciae latae), vasto lateral (m. vastus lateralis) y vasto intermedio (m. vastus intermedius). A los 4 años empezó a presentar fatiga y también dificultades para masticar y tragar.

El análisis bioquímico realizado a los 8 años indicó un ligero aumento de la CK sérica (389 UI/L). Presentó una profunda debilidad del músculo tibial anterior y se sentaba en posición cifótica. La debilidad de la cintura escapular fue demostrada por su incapacidad de elevar y mantener sus brazos en ángulo de 90°. En la actualidad el

paciente tiene 12 años, puede andar poca distancia sin ayuda y para distancias largas necesita silla de ruedas. También presenta problemas para subir escaleras. No presenta afectaciones cerebrales ni oculares.

Se le realizó una biopsia muscular a los 4 años, y el examen morfológico reveló una gran variabilidad en el diámetro de las fibras musculares con la presencia de numerosas fibras pequeñas, redondeadas y atroficas, y con un aumento del tejido conectivo endomisial y del tejido graso en el perimisio (Figura 6C). También se observó miofagia y regeneración de las fibras musculares. No se detectaron fibras rojas rasgadas, inclusiones o infiltrados inflamatorios.

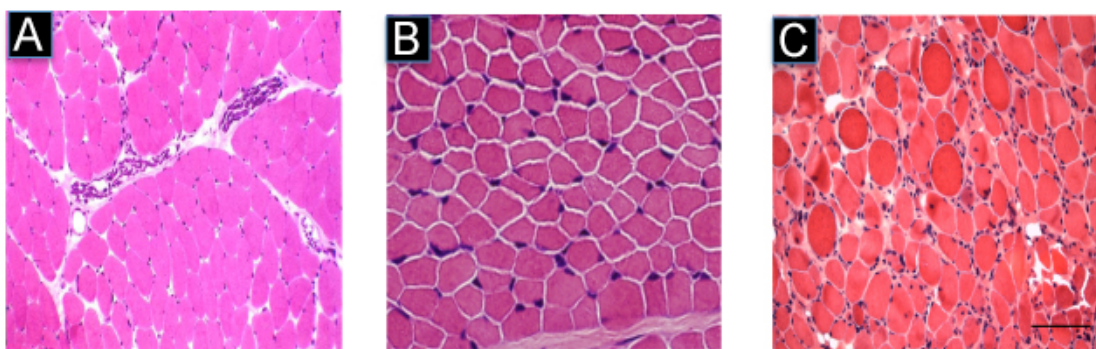


Figura 6. Análisis histológico de las biopsias de músculo esquelético de los pacientes MEB y LGMD2O. (A) Tinción hematoxilina-eosina de un músculo sano (aumento 20x). (B) Tinción hematoxilina-eosina del paciente MEB evidenciando un leve aumento en el tamaño de las fibras musculares (aumento 20x). (C) Tinción tricrómica del paciente LGMD2O evidenciando una gran variabilidad en el tamaño de las fibras musculares y con un aumento del tejido conectivo endomisial y del tejido graso en el perimisio (aumento 20x).

1.3. Familia 3 (Paciente WWS)

Línea de fibroblastos de piel aislados de un paciente diagnosticado con WWS procedente del “Coriell Institute for Medical Research” (Referencia GM16192). La biopsia de piel se le practicó a la edad de 1 mes. El diagnóstico se realizó en base a los siguientes criterios:

- malformaciones cerebrales incluyendo lisencefalia tipo II, ventriculomegalia grave e hipoplasia del cerebelo.
- presencia de anomalías oculares.
- distrofia muscular congénita con hipotonía grave.

El individuo presentó: lisencefalia tipo II, hidrocefalia diagnosticada *in utero* por RMN, hipoplasia del vermis, ausencia del septum pellucidum, hemorragia vítrea y niveles séricos de la CK de 2.200 UI/L (Manzini et al., 2008). El cariotipo fue normal.

Ya que el anonimato estaba garantizado, no fue posible ampliar la información clínica inicialmente suministrada y se desconoce la edad en la que falleció.

2. Cepas bacterianas

Para la clonación de los distintos fragmentos de interés se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α : *supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *relA1*.

3. Líneas celulares

3.1. Líneas celulares inmortalizadas: línea celular COS7 (células embrionarias de riñón de mono verde africano, *Chlorocebus aethiops*); línea celular HEK293T (células embrionarias de riñón humanas); línea celular C2C12 (mioblastos de ratón); y línea celular HBL100 (epitelio mamario humano).

3.2. Líneas celulares primarias: fibroblastos de piel aislados de un paciente con WWS (Referencia GM16192), procedente del “Coriell Institute for Medical Research” (Camden, New Jersey), y fibroblastos de piel aislados de un individuo sano (amablemente cedidas por el laboratorio del Dr. Rafael Garesse).

4. Clones IMAGE

Para el análisis de la expresión de *POMGNT1* bajo el control de las distintas regiones promotoras se utilizó el clon IMAGE 3138971 (Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression) que contiene el ADN codificante (ADNc) completo del gen *POMGNT1* y que fue adquirido de los repositorios GeneService Ltd (Cambridge, UK).

5. Vectores de clonación

- **pBluescript II SK(+)** (Fermentas), utilizado para la subclonación del ADNc del gen *POMGNT1* con el fin de llevar a cabo el ensayo de mutagénesis dirigida para corregir la mutación que presentaba.
- **pXP2**, utilizado para la clonación de las distintas regiones promotoras del gen *POMGNT1* y de la región promotora del gen de la timidina quinasa (tk) del virus del herpes simple (HSV). Es un vector que carece de promotor propio y contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga como gen testigo (amablemente cedido por el laboratorio del Dr. Rafael Garesse).

- **pSV- β -Gal**, utilizado como control positivo en los ensayos de transfección transitoria de las distintas construcciones del promotor de *POMGNT1*, para monitorizar la eficiencia de transfección. Contiene el promotor de SV40 que dirige la expresión de la enzima beta-galactosidasa codificada por el gen *lacZ* (amablemente cedido por el laboratorio del Dr. Rafael Garesse).
- **pcDNA3** (Invitrogen), contiene el epítipo Flag añadido mediante corte con las enzimas de restricción *XhoI* y *XbaI*. Se empleó para la clonación tanto de la región codificante completa del gen *POMGNT1* como de la región promotora de *POMGNT1* (-402/+644) silvestre y mutante.
- **pGEM-T easy** (Promega), utilizado para la subclonación de los productos de PCR del gen *FKTN* con el fin de confirmar las mutaciones descritas previamente en la línea celular GM16192.
- **pGIPz-shRNA^{mir}-FKTN** (Open Biosystems), es un vector lentiviral de segunda generación (pGIPz) que expresa una secuencia de inhibición shRNA dirigida contra el ARNm de la FKTN murina. Se utilizaron tres vectores distintos que contenían las siguientes secuencias de inhibición: shRNA^{mir} V3LHS_340154 (referencia RHS4430-100991947), shRNA^{mir} V2LMM_260742 (referencia RMM4431-98723476) y shRNA^{mir} V2LMM_58746 (referencia RMM4431-99214801).
- **pGIPz-shARN^{mir}-NS** (Open Biosystems), contiene la secuencia shARN^{mir}-NS (“non-silencing”) que no presenta homología con ninguna secuencia conocida de mamíferos.

6. Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo de tesis fueron diseñados utilizando el programa Oligo 6.8 para Macintosh y sintetizados por Sigma Aldrich.

6.1. En la Tabla 3 se muestran los oligonucleótidos utilizados para la clonación de la región 5' flanqueante del gen *POMGNT1* con una longitud de 2.070 pb en el vector pXP2, así como de todas las regiones promotoras derivadas de la misma por delecciones seriadas, tanto desde el extremo 5' como desde el extremo 3'.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en la clonación de las distintas variantes del promotor de *POMGNT1*.

Nombre	Secuencia (5'-3')
-1426-D	GCGAAGCTTGGGACATCTTTTCAAATGTAATAAAATG
-963-D	GCGAAGCTTTGTTAAGCTAACTGCTTTCTATG
-402-D	GCGAAGCTTACAGAACCTGGATTTTAATCTC
-52-D	GCGAAGCTTTAAGCACCGCCCGTCGCCCTC
HSV- <i>tk</i> -D	GCGAAGCTTAAATGAGTCTTCGGACCTCG
+644-R	CGCTCGAGACCGGATTGGCGGGTCACC
+148-R	CGCTCGAGCCACGCGGAGGCACTCACGGCTTAG
+25-R	CGCTCGAGGCCTGGCCCGCCCCCGCTTCC
HSV- <i>tk</i> -R	CGCTCGAGGCCTGGCCCGCCCCCGCTTCC

Las secuencias diana de las enzimas de restricción *Hind*III (5'-AAGCTT-3') y *Xho*I (5'-CTCGAG-3') se encuentran subrayadas. D: oligonucleótido directo, R: oligonucleótido reverso.

6.2. Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de la región 5' flanqueante del gen *POMGNT1* de 2.070 pb y de las distintas variantes se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en la secuenciación de las distintas variantes del promotor de *POMGNT1*.

Nombre	Secuencia (5'-3')
Pr-D1	GGATCCAAGCTCAGATCCAG
Pr-D2	GGCCTCCAATAGCTGTGCAT
Pr-R1	TCCAGGAACCAGGGCGTATC
Pr-R2	GTTATTTAAACCTGGCAATTCT
Pr-R3	CAGAACCTGGATTTTAATCTC
Pr-R4	CTTACTCGCTGGCTGCTTAC
Pr-R5	CTTGCCCCACTGAAGGGTTT

D: oligonucleótido directo, R: oligonucleótido reverso.

6.3. En las Tablas 5 y 6 se muestran los oligonucleótidos utilizados para la subclonación del ADNc completo de *POMGNT1* en el vector pBluescript KS(+) para la mutagénesis dirigida y posteriormente la clonación de la secuencia corregida en pcDNA3-Flag. En ambos casos se clonaron entre las dianas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. En la Tabla 5 se han incluido también los oligonucleótidos utilizados para la clonación del promotor de *POMGNT1* (región -402/+644) silvestre y mutado en el vector en pcDNA3-Flag entre las dianas de restricción *Bg*II y *Kpn*I.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en la clonación de *POMGNT1*.

Nombre	Secuencia (5'-3')
POMGNT1- <i>Bam</i> HI-D	CGGATCCATGGACGACTGGAAGCCCAGC
POMGNT1- <i>Eco</i> RI-R	CGAATTCTGTCTGTTCTGGGGCTCCTGGG
PrPOMGNT1- <i>Bg</i> II-D	GCAGATCTACAGAACCTGGATTTTAATCTC
PrPOMGNT1- <i>Kpn</i> I-R	CGGTACCCTGAAGGGACCAGAGGGCCAC

Las secuencias diana de las enzimas de restricción *Bam*HI (5'-GGATCC-3'), *Eco*RI (5'-GAATTC-3'), *Bg*II (5'-AGATCT-3') y *Kpn*I (5'-GGTACC-3') se encuentran subrayadas. Se señala en rojo el codón de iniciación de la traducción ATG. D: oligonucleótido directo, R: oligonucleótido reverso.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en el ensayo de mutagénesis dirigida para el gen *POMGNT1*.

Mutación en ADNc	Mutación en proteína	Secuencia (5'-3')
c.749T>A	Glu250Val	D: CATTGAGCTCAGCAG <u>A</u> AGAGGCAGAGTGCCA
		R: TGGCACTCTGCCTC <u>T</u> TCTGCTGAGCTCAATG

El nucleótido que va a ser introducido para corregir la mutación se indica en negrita y subrayado. D: oligonucleótido directo, R: oligonucleótido reverso.

6.4. Los oligonucleótidos utilizados para la detección de los factores de transcripción que regulan la actividad transcripcional del gen *POMGNT1* se muestran en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados en el ensayo de PCR posterior a la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Nombre	Secuencia (5'-3')
Sp1 sitio 1-D	TGTGCATGCCCCAGGACTAGGTA
Sp1 sitio 1-R	TCACAGGGCACGCCAGGGTCAGA
Sp1 sitios 3 y 4-D	CCTAAGCACCGCCCGTCGCCCTC
Sp1 sitios 3 y 4-R	CTCACTGCTCGGCCCGGCTCGG
GAPDH-D	TCTCTGTGTTAGGCTCATTTGC
GAPDH-R	GCCCTGCCTTCCTCACCTGACG

D: oligonucleótido directo, R: oligonucleótido reverso.

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados en los ensayos de retardo en gel.

Nombre sonda	Secuencia (5'-3')
Sp1 sitio 1-WT-D	GTATG <u>GGGCGGG</u> TGGTGTGT
Sp1 sitio 1-WT-R	ACACACCACCC <u>GCCC</u> CATAC
Sp1 sitio 1-Mut-D	GTATG <u>GTTAC</u> GGTGGTGTGT
Sp1 sitio 1-Mut-R	ACACACCACCG <u>TAA</u> CCATAC
Sp1 sitio 4-WT-D	AAGCGGGGGG <u>GCGGG</u> CCAGGC
Sp1 sitio 4-WT-R	GCCTGGCCC <u>GCCCC</u> CGCTT
Sp1 sitio 4-Mut-D	AAGCGGGGGT <u>TAC</u> GGCCAGGC
Sp1 sitio 4-Mut-R	GCCTGGCCG <u>TAA</u> CCCCCGCTT
Sp1 sitio 5-WT-D	GCCGGGGC <u>GCGGG</u> CCGCAAG
Sp1 sitio 5-WT-R	CTTGCGGCCCC <u>GCCCC</u> GCGC
Sp1 sitio 4-Mut-D	GCCGGT <u>TAC</u> GCGGCCGCAAG
Sp1 sitio 4-Mut-R	CTTGCGGCCCCG <u>TAA</u> CCGCGC
Ets-1 sitio 1-WT-D	GCGGCGCG <u>GAA</u> GCGGGGG
Ets-1 sitio 1-WT-R	CCCCCGCT <u>TCC</u> GCCGCCGC
Ets-1 sitio 1-Mut-D	GCGGCGGCT <u>TAA</u> GCGGGG
Ets-1 sitio 1-Mut-R	CCCCCGCT <u>TAA</u> GCCGCCGC
GATA sitio 2-WT-D	GCTGGGGCAG <u>ATAG</u> GATGGGAC
GATA sitio 2-WT-R	GTCCCATCCTATCTGCCCCAGC
GATA sitio 2-Mut-D	GCTGGGGCAC <u>CTAG</u> GATGGGAC
GATA sitio 2-Mut-R	GTCCCATCCT <u>AGGT</u> GCCCCAGC
ZNF202 WT-D	ACGCCGCTGCC <u>GCC</u> ACCGCCG
ZNF202 WT-R	CGGCGGT <u>GCGGC</u> AGCGGCGT
ZNF202 Mut-D	ACGCCGCTGCC <u>AAAG</u> CCGCCG
ZNF202 Mut-R	CGGCGGCTT <u>TGG</u> CAGCGGCGT
ZNF202 Dup-D	CTGCC <u>GCC</u> ACCGCC <u>GCC</u> ACCGC
ZNF202 Dup-R	GCGGT <u>GCGGC</u> GCGGT <u>GCGGC</u> AG
ZNF202 Ctrl-D	ATAAGGAGGGGT <u>GGGGGT</u> GGGGGGTCATTG
ZNF202 Ctrl-R	CAATGACCCCCC <u>ACCCC</u> ACCCCTCCTTAT

Las secuencias de reconocimiento de factores de transcripción se encuentran subrayadas. D: oligonucleótido directo, R: oligonucleótido reverso.

6.5. Oligonucleótidos utilizados para estudios de expresión mediante RT-PCR y diseñados en base a la secuencia de ADNc de *Macaca mulatta* (un cercopiteco muy relacionado con *Chlorocebus aethiops*) (Tabla 9). Se diseñaron para que reconocieran la secuencia correspondiente a dos exones consecutivos con el fin de descartar posibles resultados erróneos debidos a contaminación con ADN genómico.

Tabla 9. Oligonucleótidos empleados en ensayos de RT-PCR.

Nombre	Secuencia (5'-3')
Sp1-D	CCTGGTCATACTGTGGGAAAC
Sp1-R	TGCCCACACTCAGAGCTACAC
Ets1-D	CGATCTCAAGCCGACTCTCAC
Ets1-R	CCCAGTCGTTGCTGTTCTTTA
ZNF202-D	TATGCTTTTCCCAGGACCAGTG
ZNF202-R	TCAGGATTTCTGGCTCTTGAGT
GATA-1-D	ACAGGCCACTATCTATGCAAT
GATA-1-R	GCATTTCTCCGCCACAGTGTC
GATA-2-D	ACTACCTGTGCAATGCCTGTG
GATA-2-R	TCTTCATGGTCAGTGGCCTGT
GATA-3-D	AACATCGACGGTCAAGGCAAC
GATA-3-R	CGTCTTGAGAGAAGGGACTGAG
GATA-4-D	TCTCACTACGGGCACAGCAG
GATA-4-R	GACTGGCTGACGGGAGACAC
GATA-5-D	CGGGTGAGGGTCGTGAGTGT
GATA-5-R	GTGTTGGTCGTGTGGCAGTT
GATA-6-D	CCGTGTGCAATGCTTGTGGA
GATA-6-R	AAGAGGTGGAAGTTGGAGTC

D: oligonucleótido directo, R: oligonucleótido reverso.

6.6. La información detallada de las sondas TaqMan (Applied Biosystems) y de los oligonucleótidos utilizados para los ensayos de RT-PCR cuantitativa se indican en las Tablas 10 y 11. Todos los oligonucleótidos se diseñaron para que reconocieran la secuencia correspondiente a dos exones consecutivos con el fin de evitar amplificaciones inespecíficas debidas a posibles contaminaciones con ADN genómico.

Tabla 10. Sondas TaqMan empleadas en el ensayo de RT-PCR cuantitativa.

Número	Nombre del gen	Secuencia (5'-3')	Referencia
1	<i>POMT1</i>	GACCACCTGTGCAGGTCCCAGCTCC	Hs01059558
2	<i>POMT2</i>	CGTCAGCAGCAGGTCACCACCTATT	Hs00203575
3	<i>POMGNT1</i>	TGGATGGCACCACGGTGCTGGAGGA	Hs00214729
4	<i>FKTN</i>	AAATTCAAATACCTGTTTCCGAAGT	Hs01121845
5	<i>FKRP</i>	AACCTAGGAGGTGCAGGGACTGAGG	Hs00225601
6	<i>LARGE</i>	TATGAGTACCTCAGGAAGTCTGTCA	Hs00191000
7	<i>DAG1</i>	ATCATCAAGGTATCAGCGGCAGGGA	Hs00189308
8	<i>Fktn</i>	GCAAGGAATGGACCGGGTTCATCAA	Mm00519882

Tabla 11. Oligonucleótidos empleados en los ensayos de RT-PCR cuantitativa.

Nombre	Secuencia (5'-3')
POMGNT1-D	TGACCCACTCCCAGACAACA
POMGNT1-R	GTAGCCGTCAATGAAACT
Pomt1-D	TGCTCATTGAGAACGCCCTGA
Pomt1-R	CACGCGCATATTTGACAAGG
Pomt2-D	TCCCAAATTGCCAAACATCAG
Pomt2-R	ATTCAGCCACCAGACCACAGG
Pomgnt1-D	TGTATGTGGCTGTGGATGGC
Pomgnt1-R	ACCCTCATCCTTCACCGTGC
Fktn-D	GTTTGGGAAGGTGGAAGACAG
Fktn-R	CAATGTAGTCAACCGTTTCAC
Fkrp-D	CCACGGCGACATCATCCCTT
Fkrp-R	GTCGCCCTCCACCGCCTTCT
Large-D	AGCTGTGGAAAAGTGTGAGACC
Large-R	TCCAGGACACTTCAGACTTGAG
Dag1-D	GGGGAGATCATCAAGGTGTCTG
Dag1-R	GGTCTGATGAGGCTGCCCCGTA

D: oligonucleótido directo, R: oligonucleótido reverso.

7. Anticuerpos

7.1. Anticuerpos primarios, diluciones utilizadas y procedencia

- Anti- α -dystroglicano (IIH6C4). Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce residuos glicosídicos del α -DG. Utilizado en Western blot (WB) a una dilución 1:500 (Millipore).
- Anti- α -dystroglicano (VIA4-1). Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce residuos glicosídicos del α -DG. Utilizado en inmunohistoquímica (IHQ) a una dilución 1:25 y en inmunoprecipitación (IP) (0,2 μ g/ μ l) (Millipore).
- Anti- α -dystroglicano (p α DAG). Anticuerpo policlonal generado en oveja que reconoce una secuencia peptídica de 20 aminoácidos del dominio C-terminal del α -DG de pollo. Utilizado en IHQ a una dilución 1:25 y en WB a una dilución 1:500. Fue cedido amablemente por el Dr. Stephan Kröger (Universidad de Munich, Alemania).
- Anti- α -dystroglicano (DAG1 MAB371). Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce una secuencia peptídica de 32 aminoácidos del dominio C-terminal del α -DG humano. Utilizado exclusivamente en IP (0,2 μ g/ μ l) (Millipore).
- Anti- α -dystroglicano (DAG1 M01). Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce una secuencia peptídica de 110 aminoácidos del dominio N-terminal del α -DG humano. Utilizado en WB a una dilución 1:500 y en IP (0,2 μ g/ μ l) (Abnova).
- Anti- β -dystroglicano (β -DG, 43DAG1/8D5). Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce una secuencia peptídica de 15 aminoácidos del dominio C-terminal del β -DG humano. Utilizado en WB a una dilución 1:1.000 y en IHQ a una dilución 1:25 (Novocastra).
- Anti FLAG M2. Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce el epítipo FLAG de etiquetado de vectores de expresión eucariota. Utilizado en WB a una dilución 1:1.000 y en inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) (4 μ g) (Stratagene).
- Anti- β -actina. Anticuerpo monoclonal de ratón contra la actina humana y utilizado en WB a una dilución 1:5.000 (Sigma).
- Anti-laminina. Anticuerpo policlonal producido en conejo contra la laminina humana y utilizado en WB a una dilución 1:1.000 y en IHQ a una dilución 1:50 (Sigma).

- Anti-Sp1 (Sp1 sc-420X). Anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce una secuencia de 18 aminoácidos del dominio interno de Sp1 humano. Utilizado en super-retardo en gel (2 µg) y ChIP (4 µg) (Santa Cruz Biotechnology).
- Anti-GATA-1 (M-20X). Anticuerpo policlonal generado en cabra que reconoce una zona peptídica del dominio C-terminal de GATA-1 humano. Utilizado en super-retardo en gel (2 µg) (Santa Cruz Biotechnology).

7.2. Anticuerpos secundarios, diluciones utilizadas y procedencia

- Anti-IgG de ratón producido en cabra y acoplado a peroxidasa. Utilizado en WB a una dilución 1:10.000 (Santa Cruz Biotechnology).
- Anti-IgG de conejo producido en cabra y acoplado a peroxidasa. Utilizado en WB a una dilución 1:10.000 (Santa Cruz Biotechnology).
- Anti-IgG de oveja producido en burro y acoplado a peroxidasa. Utilizado en WB a una dilución 1:10.000 (Santa Cruz Biotechnology).
- Anti-IgG de ratón producido en cabra y acoplado al fluorocromo 488. Utilizado en IHQ a una dilución 1:500 (Molecular Probes).
- Anti-IgG de conejo producido en cabra y acoplado al fluorocromo 488. Utilizado en IHQ a una dilución 1:500 (Molecular Probes).

8. Reactivos, soluciones y tampones

Todos los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron de grado analítico o de grado apto para las técnicas de Biología Molecular. La composición de las soluciones y tampones empleados en los distintos experimentos se incluye en la descripción de los métodos o, en su defecto, en la bibliografía correspondiente.

Métodos

1. Análisis molecular de los genes responsables de distroglicanopatía

1.1. Selección de genes candidatos

Para el estudio molecular de los pacientes diagnosticados con distroglicanopatía, la prioridad de los genes candidatos a analizar se estableció en base a las características clínicas de cada uno de los pacientes.

Para los pacientes diagnosticados con MEB el orden de prioridad de los genes fue: *POMGNT1*, *POMT1*, *POMT2*, *FKRP*, *FKTN*, *LARGE* y *DAG1*.

Para los pacientes con LGMD la selección de los genes se realizó de la siguiente manera: *FKRP*, *POMGNT1*, *FKTN*, *LARGE*, *DAG1*, *POMT1* y *POMT2*.

Se analizaron las secuencias codificantes completas de los genes, las regiones intrónicas flanqueantes, así como las zonas promotoras y también las regiones 3' UTR que contienen la señal de poliadenilación.

En el presente trabajo se han incluido sólo los pacientes cuyo diagnóstico de distroglicanopatía se pudo confirmar mediante análisis genético y molecular.

1.2. Extracción de material genético

La extracción del material genético de muestras de sangre periférica (paciente MEB) se realizó utilizando el kit “Nucleon extraction and purification” (Amersham Bioscience). El ADNg del paciente LGMD fue enviado directamente desde el Centro de Genética Médica de Gante (Bélgica). Para el paciente WWS (línea celular GM16192) y para todas las líneas celulares utilizadas en este trabajo, la extracción de ADN y ARN se llevó a cabo utilizando el kit “Masterpure complete DNA and RNA purification” (Epicentre Biotechnologies).

1.3. Amplificación mediante PCR y purificación de los amplicones

Las amplificaciones mediante la reacción de PCR se realizaron en una mezcla de reacción hasta un volumen final de 25 µl y con la siguiente composición: 100 ng de ADNg molde; 1x tampón de reacción; 1,5-2,5 mM MgCl₂; 800 µM dNTPs (Roche); 0,2 mM de los oligonucleótidos requeridos (Sigma) y 0,625 U de Taq ADN polimerasa termoestable Biotaq. La enzima, el tampón de reacción y la solución de MgCl₂ fueron suministrados por Ecogen.

Los programas de PCR se diseñaron y optimizaron según las características de cada pareja de oligonucleótidos. Se utilizó un termociclador modelo PTC-100 (Peltier Thermal Cycler, M.J. Research). El tamaño de los amplicones se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa (Agarose D1 Medium EEO. Conda) del porcentaje apropiado, y posteriormente se purificaron empleando el kit “NucleoSpin Extract II” (Macherey Nagel).

1.4. Secuenciación directa y análisis de secuencias

La secuenciación directa de ADN se llevó a cabo en un secuenciador ABI PRISM 3130x1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). El análisis mutacional de las secuencias se realizó mediante el programa informático GeneJockey II para Macintosh.

1.5. Análisis del ADN por endonucleasas de restricción

La identificación de las variaciones de secuencia c.1496G>A y c.1545delC presentes en el gen *POMGNT1* (paciente MEB y sus padres) se confirmó por digestión con las enzimas de restricción *HpyCH4V* y *StuI*, respectivamente (Fermentas).

2. Generación de construcciones plasmídicas

2.1. Aislamiento y clonación del promotor de *POMGNT1* humano

Una región 5' flanqueante de 2.070 pb del gen *POMGNT1* humano que contiene: un fragmento de 1.426 pb por delante del sitio de iniciación de la transcripción (+1), el primer exón no codificante (de 130 pb), el intrón 1 (de 464 pb) y parte del exón 2 (50 pb) hasta el codón de iniciación de la traducción (ATG), se amplificó por PCR utilizando como molde el ADNg extraído a partir de muestra de sangre periférica de un individuo sano y empleando el kit “Expand High Fidelity PCR System” (Roche).

En la mezcla de reacción se añadió 1 M betaína debido el alto contenido en GC del fragmento a amplificar. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la Tabla 3. Posteriormente, dicho fragmento se clonó en el vector pXP2 entre las dianas de restricción *HindIII* y *XhoI*, y se generó la construcción pXP2(-1426/+644). Las enzimas de restricción utilizadas fueron de Fermentas; para la defosforilación de los vectores se utilizó la fosfatasa alcalina termosensible TSAP (Promega); y para la ligación de los fragmentos de ADN de interés (a 4 °C durante una noche) se usó la ADN ligasa T4 (Roche) siguiendo las instrucciones de cada uno de los fabricantes.

Los plásmidos resultantes fueron transformados en bacterias competentes *E. coli* DH5 α y los clones bacterianos fueron seleccionados mediante digestión con las enzimas de restricción correspondientes. El aislamiento del ADN plasmídico de los cultivos bacterianos se llevó a cabo con el kit “NucleoSpin Plasmid” (Macherey Nagel).

2.2. Generación de construcciones para el análisis del promotor de *POMGNT1*

Se realizaron delecciones seriadas, tanto desde el extremo 5' como desde el extremo 3' del fragmento de 2.070 pb correspondiente a la región 5' flanqueante del gen *POMGNT1*, utilizando como molde para la reacción de PCR la construcción pXP2(-1426/+644).

Las construcciones resultantes fueron las siguientes: pXP2(-963/+644), pXP2(-402/+644), pXP2(-52/+644), pXP2(-1426/+25), pXP2(-402/+148) y pXP2(-402/+25). Como control positivo se generó la construcción HSV-*tk*-pXP2, utilizando un fragmento de 770 pb del promotor de la timidina quinasa que se amplificó por PCR utilizando como molde el vector pTK-GLuc (New England Biolabs).

Las regiones promotoras -402/+644 y -1426/+644 que contenían la duplicación de 9 pb (-83_-75dup) se amplificaron a partir de ADN_g extraído de muestra de sangre del paciente LGMD. Las construcciones resultantes se nombraron: pXP2(-402/+644Mut) y pXP2(-1426/+644Mut). Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la Tabla 3. Todos los fragmentos de PCR se clonaron en el vector pXP2 entre las dianas de restricción *Hind*III y *Xho*I. Todas las construcciones se secuenciaron para confirmar la falta de variaciones de secuencia, utilizando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 4.

2.3. Clonación de la región codificante del gen *POMGNT1* y mutagénesis dirigida

Para la clonación del ADN_c completo de *POMGNT1* se utilizó como molde el clon IMAGE 3138971. La secuenciación del inserto de este clon evidenció la presencia de un cambio nucleotídico (c.749T>A, p.Glu250Val) descrito como SNP (rs: 17855359). Sin embargo, el análisis de conservación evolutiva reveló una gran conservación del residuo Glu entre los vertebrados (datos no mostrados). Por ello se decidió la corrección del cambio por mutagénesis dirigida. El ADN_c de *POMGNT1* sin el codón stop (TGA) se amplificó por PCR empleando la ADN polimerasa de alta fidelidad Pfu Ultra (Stratagene) y los oligonucleótidos POMGNT1-*Bam*HI-D y POMGNT1-*Eco*RI-R indicados en la Tabla 5.

Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 minutos a 94 °C; 10 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 62 °C, 1 minuto y 30 segundos a 72 °C; 25 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C, 1 minuto y 30 segundos a 72 °C; y finalmente 1 ciclo de 7 minutos a 72 °C.

El fragmento amplificado se subclonó en el vector pBluescript II KS(+) y la mutagénesis dirigida se llevó a cabo utilizando el kit “QuikChange® Site-Directed Mutagenesis” (Stratagene). Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando la aplicación informática de Stratagene indicada en la URL: <http://labtools.stratagene.com/QC> (Tabla 6).

La secuencia de ADNc de *POMGNT1* corregida se clonó en el vector pcDNA3 etiquetado con Flag, dando lugar a la construcción P_{CMV}-*POMGNT1*-pcDNA3 que mantenía el promotor CMV original del vector.

2.4. Clonación del promotor proximal para analizar los niveles de expresión de *POMGNT1*

Los promotores de T7 y de CMV de la construcción P_{CMV}-*POMGNT1*-pcDNA3 se eliminaron, y las regiones promotoras: -402/+644 silvestre (-402/+644WT) y la que contenía la mutación -83_-75dup (402/+644Mut) se insertaron entre las dianas de restricción *Bgl*II y *Kpn*I, dando lugar a las construcciones: P_{WT}-*POMGNT1*-pcDNA3 y P_{Mut}-*POMGNT1*-pcDNA3.

Para ello, las regiones promotoras -402/+644WT y -402/+644Mut se amplificaron por PCR utilizando como molde las construcciones: pXP2(-402/+644) y pXP2(-402/+644Mut) y empleando la ADN polimerasa de alta fidelidad Pfu Ultra (Stratagene) y los oligonucleótidos PrPOMGNT1-*Bgl*II-D y PrPOMGNT1-*Kpn*I-R (Tabla 5).

2.5. Purificación de ADN plasmídico

La purificación de ADN plasmídico a gran escala, de alta concentración y con alto grado de pureza, para su posterior uso en transfección de células, se realizó mediante el kit “PureYield Plasmid Maxiprep System” (Promega).

3. Estudio de la actividad promotora del gen *POMGNT1*

3.1. Transfección transitoria en cultivos de células y determinación de la actividad promotora

Las células COS7 y HEK293T se crecieron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ en un medio de crecimiento que consistía en: DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco) suplementado con 4,5 g/L glucosa, 4 mM glutamina, 100 mg piruvato de sodio, 10% suero fetal bovino, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina.

Las células se sembraron un día antes de la transfección en placas de 60 mm² en medio de crecimiento sin antibiótico a una densidad de 8 x 10⁵ células por placa. Las transfecciones con las diferentes construcciones se realizaron con lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante, y utilizando 8 µg de ADN de la construcción correspondiente y 1,6 µg del plásmido pSV-β-Gal que sirvió de control interno para normalizar la eficiencia de transfección. Cada construcción se transfectó por triplicado y en tres ensayos independientes. A las 48 horas las células se lisaron y se determinaron las actividades luciferasa y beta-galactosidasa utilizando los kits “Luciferase Assay system” y “β-galactosidase enzyme assay system” (Promega).

Para determinar los niveles de expresión de *POMGNT1*, tanto de ARNm como de proteína, se emplearon las construcciones: P_{CMV}-*POMGNT1*-pcDNA3, P_{WT}-*POMGNT1*-pcDNA3 y P_{Mut}-*POMGNT1*-pcDNA3, las cuales se transfectaron transitoriamente en células COS7 utilizando también lipofectamina 2000. Para este ensayo, las células se sembraron en placas de 100 mm² y la extracción de ARN y proteína total se realizó a las 48 horas post-transfección.

3.2. Extracción de proteínas nucleares

Las células COS7 (9 x 10⁶ células) se lavaron 2 veces con PBS 1x frío y se lisaron en 100 µl de tampón A frío (20 mM Hepes pH 8; 10 mM KCl; 0,15 mM EDTA; 0,15 mM EGTA; 1,2% Tritón X100; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 1 µg leupeptina; 0,5 µg pepstatina y 0,5 µg aprotinina). Tras 15 minutos de incubación en hielo, se añadieron 20 µl de tampón sacarosa frío (50 mM Hepes pH 7; 0,2 mM EDTA; 10 M KCl y 70% sacarosa). El lisado celular se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El sedimento de núcleos se lavó una vez con 50 µl de tampón B frío (20 mM Hepes pH 8; 50 mM NaCl; 25% glicerol; 0,25 mM EDTA; 0,15 mM EGTA; 1,5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 1 µg leupeptina y 0,5 µg pepstatina) y se centrifugó a 5.000 rpm

durante 5 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y los núcleos se lisaron en 30 µl de tampón C frío (20 mM Hepes pH 8; 0,4 M NaCl; 25% glicerol; 0,2 mM EDTA; 0,15 mM EGTA; 1,5 mM NaCl; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 1 µg leupeptina y 0,5 µg pepstatina) y se incubaron durante 30 minutos en rotación a 4 °C. Los lisados nucleares se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se determinó la concentración proteica.

3.3. Retardo y super-retardo en la movilidad electroforética (EMSA)

Para los ensayos de retardo y super-retardo en gel se utilizaron extractos nucleares de células COS7 obtenidas según el apartado 3.2 de esta sección. Los oligonucleótidos empleados en este ensayo (Tabla 8) se marcaron con 25 µCi de [γ -³²P]-ATP utilizando la enzima polinucleótido quinasa de T4 (Promega) según las instrucciones del fabricante. El exceso de radiactividad no incorporada se eliminó mediante cromatografía en columnas de sephadex G25 (illustra MicroSpin G25 column, GE Healthcare).

Los extractos nucleares (5 µg) se preincubaron en hielo durante 15 minutos en un tampón con la siguiente composición: 20 mM Hepes; 70 mM NaCl; 2,5 mM DTT; 0,05% Nonidet P-40; 50 µg BSA; 2% ficoll y 2 µg poly(dI-dC). Posteriormente se añadieron 100.000 cpm de los oligonucleótidos marcados de doble cadena correspondientes, y la reacción de unión ADN-proteína se llevó a cabo durante 20 minutos a T^a ambiente. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% (no desnaturizante) en tampón TBE 0,5x a 90 V durante 1 hora y a 4 °C. Posteriormente los geles fueron secados a 80 °C durante 2 horas y se expusieron en placas fotográficas durante 18-24 horas a -80 °C.

En los ensayos de competición, a la mezcla de reacción se le añadió un exceso de 100 veces de los oligonucleótidos de doble cadena correspondientes sin marcaje radiactivo. En los ensayos de super-retardo en gel, antes de la adición de los oligonucleótidos marcados, los extractos nucleares se preincubaron con 2 µg de anti-Sp1 o anti-GATA-1 durante 30 minutos en hielo.

3.4. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Las células COS7 crecidas a confluencia se lavaron 2 veces con PBS 1x frío y se despegaron con tripsina-EDTA (1 ml por placa p100). Se pasaron a tubos tipo “falcon” de 15 ml utilizando 8 ml de PBS frío, y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos

a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se trató con una solución de formaldehído al 1% en DMEM completo durante 10 minutos a 37 °C. Tras centrifugar a 1.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, las células se lisaron en 100 µl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8,1; 10 mM EDTA; 1% SDS; 1x “cocktail” de inhibidores de proteasas “Complete Mini EDTA-free”, Roche; y 1x MG-132, Sigma). Posteriormente se añadieron 100 µl de tampón de dilución (16,7 mM Tris-HCl pH 8,1; 1,2 mM EDTA; 167 mM NaCl; 0,01% SDS; 1,1% Tritón X-100; 1x “cocktail” de inhibidores de proteasas EDTA-free y 1x MG-132), y las muestras fueron sonicadas 10 veces durante 15 segundos y diluidas 10 veces en tampón de dilución. Este producto final constituye el denominado lisado celular.

Este lisado se incubó en agitación con proteína G-sefárosa durante 2 horas a 4 °C. Tras centrifugar a 1.000 xg se tomaron alícuotas del sobrenadante y las muestras fueron incubadas con el anticuerpo anti-Sp1 (4 µg) durante toda la noche a 4 °C en agitación, utilizando como controles negativos el anticuerpo anti-FLAG M2 (4 µg) o sin anticuerpo. Los inmunocomplejos fueron incubados con proteína G-sefárosa durante 2 horas a 4 °C, seguidas de lavados sucesivos de 5 minutos con tampones de baja sal, de alta sal, LiCl, y finalmente dos lavados con TE pH 8,0.

La composición del tampón de baja sal es: 20 mM Tris-HCl pH 8,1; 2 mM EDTA; 150 mM NaCl; 0,1% SDS y 1% Tritón X-100.

La composición del tampón de alta sal es: 20 mM Tris-HCl pH 8,1; 2 mM EDTA; 500 mM NaCl; 0,1% SDS y 1% Tritón X-100.

La composición del tampón LiCl es: 10 mM Tris-HCl pH 8,1; 1 mM EDTA; 250 mM LiCl y 1% NP-40.

Los complejos proteína/ADN/proteína G-sefárosa fueron resuspendidos en 250 µl de tampón de elución (100 mM NaHCO₃ y 1% SDS) e incubados toda la noche a 65 °C en presencia de proteinasa K (20 µg/ml) para revertir la unión proteína/ADN. El ADN fue recuperado mediante extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y posterior precipitación con etanol en presencia de 0,3 M acetato potásico pH 4,8.

El ADN fue utilizado como molde en la reacción de amplificación de la región promotora de *POMGNT1* que contiene los elementos de unión de Sp1, empleando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 7. Los productos de PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 2% y visualizados mediante “SYBR[®] Safe DNA gel stain” (Invitrogen).

3.5. Transcripción de ARN total a ADNc (RT-PCR)

La generación de ADNc se realizó mediante retrotranscripción, utilizando como enzima la transcriptasa en reverso de M-MLV (Moloney murine leukemia virus, Invitrogen). Se utilizaron 500 ng de ARN total, y la reacción se realizó en un volumen final de 20 µl con 10 ng de hexanucleótidos al azar, 50 U de inhibidor de RNasa, 10 µM DTT y 200 U de enzima. El ARN total se desnaturalizó a 65 °C durante 10 minutos, seguido de una incubación de 5 minutos en hielo. El programa utilizado en la reacción de retrotranscripción fue: un ciclo a 42 °C durante 1 hora seguido de un paso de inactivación de la enzima a 95 °C durante 5 minutos. El ADNc obtenido se utilizó como molde en las reacciones de PCR empleando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 9.

3.6. Cuantificación de la expresión génica. RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Los ensayos de RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) se llevaron a cabo utilizando muestras de ARN total de distintas líneas celulares o de biopsia muscular según procede.

En el caso de paciente LGMD2O, para la cuantificación de los niveles de expresión del ARNm de *POMGNT1* se utilizó ARN total extraído a partir de células COS7 transfectadas con las construcciones: P_{CMV}-*POMGNT1*-pcDNA3, P_{WT}-*POMGNT1*-pcDNA3 y P_{Mut}-*POMGNT1*-pcDNA3. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la Tabla 11.

Para la determinación de los niveles de expresión de los genes: *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN*, *FKRP*, *LARGE* y *DAG1* en distintas líneas celulares, tanto humanas (HEK293T y HBL100) como de ratón (C2C12), y también en músculo de ratón, se emplearon las sondas TaqMan (1-7) y los oligonucleótidos indicados en las Tablas 10 y 11, respectivamente.

La extracción del ARN total de las líneas celulares mencionadas anteriormente (tanto silvestres como transfectadas) se realizó utilizando el reactivo “TRIzol reagent” (Invitrogen) y en el caso del músculo de ratón la extracción del ARN total se llevó a cabo empleando el kit “Masterpure complete DNA and RNA purification” (Epicentre Biotechnologies).

Para la cuantificación de los niveles de expresión del ARNm del gen *FKTN* en la línea celular estable C2C12 deficiente en *FKTN* se empleó la sonda TaqMan número 8

indicada en la Tabla 10. Para la extracción del ARN total se utilizó el kit “RNeasy[®] Mini” (Qiagen).

Brevemente, se realizó la retrotranscripción de los ARN utilizando el kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (AppliedBiosystems) según las instrucciones del fabricante. A continuación se llevó a cabo la qRT-PCR utilizando el equipo 7900 Fast Real-Time PCR System (AppliedBiosystems), y empleando las sondas TaqMan o los oligonucleótidos (Power SYBR Green PCR Master Mix) correspondientes. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 10 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. Todas las muestras se analizaron por triplicado y en tres ensayos independientes. Los datos fueron analizados utilizando el programa informático “sds 2.2”. Los niveles relativos de expresión de los genes de interés se normalizaron con respecto a los niveles del gen endógeno 18S del rRNA.

4. Estudio de la expresión proteica

4.1. Extracción de proteína total de líneas celulares y biopsias musculares

Para la extracción de proteína total a partir de células en cultivo se lavaron las células dos veces con PBS 1x frío y se lisaron directamente en la placa de cultivo en un tampón de lisis consistente en: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 2 mM EDTA; 0,1% SDS y 1% Tritón X-100, al que se le añadieron los inhibidores de proteasas: leupeptina (0,5 µg/ml), aprotinina (10 µg/ml), pepstatina (1 µg/ml), PMSF (1 mM) y el “cocktail” de inhibidores de proteasas EDTA-free 1x (Roche).

El volumen de tampón de lisis fue variable según el tipo de placa de cultivo. Para las placas de 100 mm² se añadieron 50-70 µl de tampón de lisis y para las placas de 150 mm² se emplearon entre 200 y 250 µl de tampón de lisis dependiendo de la confluencia celular. Las células se pasaron a tubos limpios y se incubaron durante 20 minutos a 4 °C. El lisado celular se centrifugó a 13.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se pasaron a tubos limpios y se guardaron a -70 °C.

El procedimiento de extracción de proteína total a partir de biopsia muscular fue similar a la extracción de células en cultivo excepto el primer paso de lisis celular, donde la biopsia muscular (aproximadamente 300 mg) se lisó mediante N₂ líquido en mortero de porcelana y posteriormente se le añadió el tampón de lisis (0,8-1 ml).

4.2. Determinación de la concentración proteica

Los extractos proteicos totales o nucleares se cuantificaron mediante el método colorimétrico de Bradford.

4.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (Western blot)

Para los ensayos de WB se utilizó el sistema de electroforesis de proteínas “Mini-PROTEAN® 3 cell” (BIO-RAD). Los porcentajes de poliacrilamida de los geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) fueron variables según el tamaño molecular de la proteína a detectar: del 7% para la detección del α -DG y del 10% para la detección del β -DG, de la β -actina y de POMGNT1-FLAG. El espesor de los geles fue de 0,75 ó 1,5 mm según el volumen de muestra a cargar.

Las muestras, con un contenido de proteína total entre 50 y 150 μ g, se trataron con tampón Laemmli y se incubaron a 95 °C durante 5 minutos antes de ser sometidas a electroforesis a un voltaje constante de 200 V. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Protran, Whatman) o PVDF Immobilon-P (Millipore) a una intensidad de corriente de 200 mA (geles 0,75 mm) o de 257 mA (geles de 1,5 mm) durante 90 minutos a T^a ambiente en tampón de transferencia de proteínas.

Las membranas se incubaron en una solución de bloqueo consistente en: leche desnatada al 5% o al 3% en TBS-T (TBS 1x con 0,1 % Tween-20) durante 1 hora a T^a ambiente. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo durante 1 hora a T^a ambiente, o durante toda la noche a 4 °C. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa diluidos 1:5.000 ó 1:10.000 en solución de bloqueo durante 1 hora a T^a ambiente. Tras la incubación con los anticuerpos secundarios se realizaron tres lavados de 10-15 minutos con TBS-T. La detección se realizó mediante el sistema ECL (Amersham Biosciences).

4.4. Ensayo de revestimiento con laminina (Laminin Overlay).

El propósito de esta técnica es evaluar la capacidad de unión del α -DG a la laminina. Después de transferir las proteínas, las membranas de PVDF se bloquearon en leche al 5% en tampón de unión de la laminina (LBB1: 1 mM CaCl₂ y 1 mM MgCl₂ en TBS-T) durante 1 hora a T^a ambiente. Las membranas se lavaron 2 veces con LBB1 y se incubaron con 10 mg/ml de laminina (Sigma) en solución de bloqueo de BSA al 3% en TBS-T durante toda la noche a T^a ambiente.

Posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo primario (anti-laminina), que permite la detección tanto de la laminina propia del tejido como de la que se ha unido al α -DG a través de los residuos glicosídicos. Después de realizar tres lavados de 10 minutos con TBS-T se añadió el anticuerpo secundario y se realizó la detección de manera similar a la utilizada en el ensayo de WB.

4.5. Ensayo de inmunohistoquímica

Para el análisis inmunohistoquímico se realizaron criosecciones de tejido muscular (de 10 μ m de grosor) proveniente de biopsias de pacientes en un criostato “Leica Cryocut 1900” (Leica Microsystems). Las secciones de tejido se atemperaron durante 10 minutos y se fijaron en una solución de metanol al 80% y acetona al 20% durante 20 minutos a -20 °C. Posteriormente se bloquearon durante 40 minutos en cámara húmeda en una solución consistente en: 3% BSA, 5% suero normal de cabra (o de la especie donde esté hecho el anticuerpo secundario) y 0,3% Tritón X-100 en PBS 1x.

Los anticuerpos primarios se diluyeron en solución de bloqueo y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Tras tres lavados con PBS 1x, las secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios diluidos en solución de bloqueo durante 30-40 minutos a Tª ambiente y en cámara húmeda. Después de la incubación con DAPI diluido 1:500 en PBS 1x, las secciones se lavaron 2 veces con PBS 1x y se montaron con el medio “Prolong gold” (Invitrogen).

El análisis inmunohistoquímico del paciente LGMD2O se llevó a cabo empleando el método avidina-biotina-peroxidasa (“kit ABC” de Vector Laboratories). Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal “Spectral Leica TCS SP5” (Leica Microsystems) perteneciente al Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la U.A.M.

5. Purificación y caracterización glicoproteómica del α -dystroglicano nativo de ratón

5.1. Cultivo de mioblastos de ratón (células C2C12) y diferenciación a miotubos

La línea celular C2C12 fue amablemente cedida por el laboratorio de la Dra. Margarita Cervera. Las células se crecieron a baja densidad (confluencia inferior al 60%) en DMEM suplementado con 4,5 g/L glucosa, 4 mM glutamina, 100 mg/L piruvato de sodio, 10% suero fetal bovino y 50 μ g/ml gentamicina. Para la

diferenciación de los mioblastos a miotubos, las células se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 90% y se sustituyó el FBS al 10% con suero de caballo al 2%. Durante el proceso de diferenciación se cambió el medio cada 2 días. Los mioblastos diferenciados se lisaron después de 4 días de diferenciación.

5.2. Enriquecimiento de glicoproteínas

Los extractos de proteína total de mioblastos de ratón se prepararon según el apartado 4.1 de esta sección, y se sometieron a enriquecimiento con lectinas empleando la lectina de germen de trigo unida a bolitas de agarosa (WGA-agarosa, *Wheat germ agglutinin*-agarose, Vector Laboratories). El uso de esta lectina permite el enriquecimiento de glicoproteínas ricas en ácido siálico y N-acetilglucosamina, residuos ambos presentes en los O-glicanos del α -DG. El protocolo seguido se indica a continuación:

- Se transfirieron 500 μ l de WGA-agarosa a un tubo tipo “eppendorf” de 2 ml de fondo redondo.
- Se lavó la lectina con 1 ml de PBS 1x frío por tubo.
- Se centrifugó a 600 xg durante 5 minutos a 4 °C.
- Se repitió el lavado.
- Se añadieron 10 mg de extracto proteico total y se incubaron durante toda la noche a 4 °C en rotación.
- Se centrifugó a 600 xg durante 5 minutos a 4 °C y los sobrenadantes se guardaron para análisis posterior.
- Se lavó la lectina 3 veces con 1 ml de PBS con 0,1% Tritón X-100 y se centrifugó en las condiciones mencionadas anteriormente.
- Para liberar las glicoproteínas unidas a WGA-agarosa se añadieron 50 μ l de tampón de desnaturalización y se hirvieron las muestras a 100 °C durante 5 minutos.
- Los tubos se enfriaron en hielo durante 2 minutos y se añadieron 200 μ l de agua destilada a cada tubo.
- Se centrifugó a 600 xg durante 5 minutos a 4 °C.
- El sobrenadante (eluido) se recogió y se dializó en 1 L de agua destilada, utilizando los cartuchos de diálisis “Slide A-Lyzer MWCO 10.000” (Thermofisher).

5.3. Inmunoprecipitación del α -dystroglicano nativo

Para la inmunoprecipitación (IP) del α -DG se emplearon proteínas G acopladas a bolitas magnéticas (“Protein G Dynabeads”, Invitrogen). El protocolo empleado fue el siguiente:

- Se transfirieron 50 μ l de Dynabeads (DB) a un tubo de 2 ml de fondo redondo y se eliminó el sobrenadante mediante el uso del imán Dynal (Invitrogen).
- Se lavaron las DB dos veces con 200 μ l PBS con 0,02% Tween 20 (PBS-T) y se eliminó el sobrenadante.
- Se añadieron 10 μ g de anticuerpo VIA4-1 diluido en 200 μ l PBS-T y se incubaron durante 2 horas a T^a ambiente en rotación.
- Se eliminó el sobrenadante y se lavaron las DB/VIA4-1 con PBS-T tres veces.
- Las DB/VIA4-1 se incubaron con 80-90 μ g de glicoproteínas enriquecidas con WGA-agarosa, durante toda la noche a 4 °C o durante 3 horas a T^a ambiente, en rotación.
- Los sobrenadantes se guardaron para análisis futuros, y las DB/VIA4-1/ α -DG se lavaron 10 veces con PBS-T. Después del último lavado, las DB se resuspendieron en 100 μ l PBS-T y se pasaron a un tubo limpio.
- Se eliminó el sobrenadante mediante imán.
- Las DB se resuspendieron en 30 μ l de solución Laemmli 1x y las muestras se hirvieron a 100 °C durante 5 minutos.
- El eluido se pasó a tubo limpio y se analizó directamente o se guardó a -70 °C hasta su uso posterior.

5.4. Detección del α -dystroglicano

El α -DG purificado mediante IP con el anticuerpo VIA4-1 se separó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y se detectó por WB empleando el anticuerpo IIH6C4. En paralelo, la misma muestra, pero 20 veces más concentrada (20 fracciones de IP), se sometió a electroforesis y posterior tinción con azul de Coomassie. El gel se incubó en 15 ml de solución de tinción durante 40 minutos a T^a ambiente y se destiñó con una solución de metanol al 20% y ácido acético al 10%. La banda correspondiente al α -DG, y confirmada por WB, se recortó de gel y se congeló a -70 °C hasta su posterior procesamiento. Cuando la purificación del α -DG no permite visualizar la banda correspondiente al α -DG después de la tinción con

azul de Coomassie, el ensayo de WB sirve también para extrapolar la altura a la que se tiene que recortar el α -DG de gel de poliacrilamida.

5.5. Análisis glicoproteómico de los O-glicopéptidos del α -dístroglicano

La digestión en gel con tripsina del α -DG purificado según el apartado anterior y la caracterización, mediante espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía de líquidos (LC-MS/MS) de los péptidos y glicopéptidos trípticos resultantes, se realizaron en colaboración con la Dra. Ammi Grahn (Instituto de Biomedicina, Hospital Universitario Sahlgrenska, Gotemburgo-Suecia). Se utilizó un analizador de resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier (FT-ICR, Fourier transform-ion cyclotron resonance) para la determinación de las masas y la disociación inducida por colisión (CID, collision-induced dissociation) para la fragmentación de los péptidos y glicopéptidos trípticos. La caracterización de las uniones glicosídicas de los glicopéptidos se determinó a partir de los espectros de fragmentación MS2.

La identificación de los glicopéptidos se realizó utilizando la aplicación Glicomod (disponible en la página web de ExPASy, <http://web.expasy.org/glycomod/>). Los glicopéptidos asignados se evaluaron con respecto a los espectros CID-MS2 obtenidos. Además, los espectros de fragmentación CID-MS3 ofrecen información sobre la fragmentación de los esqueletos peptídicos, permitiendo la identificación de los péptidos.

6. Silenciamiento estable de la expresión de FKTN en la línea celular C2C12

Para el silenciamiento de la expresión del gen *FKTN* se emplearon los vectores pGIPz-shRNA^{mir}-FKTN indicados en el apartado 5 de “Materiales”.

Los mioblastos C2C12 se sembraron un día antes de la transfección en placas p100, en un número de aproximadamente 8×10^4 células por placa. Al día siguiente se transfectaron con cada uno de los vectores pGIPz shRNA^{mir}-FKTN por separado y el vector pGIPz shRNA^{mir}-NS (control) utilizando lipofectamina 2000. Para la selección de clones estables se añadió puromicina al medio hasta una concentración final de 5 μ g/ml y los cultivos se mantuvieron en estas condiciones hasta que todas las células de la placa control (sin transfectar) se murieron. A partir de ese momento se realizó el aislamiento de clones. Por una parte se sembraron las células en placas p100 a una

densidad de 5×10^4 , 8×10^4 y 10×10^4 células por placa, y por otra parte se realizó una dilución seriada y se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad aproximada de 1 célula por pocillo. Al día siguiente se marcaron las células aisladas y se dejaron crecer independientemente hasta formar colonias. Una vez expandidos los clones individuales, se analizó la expresión del ARNm de *FKTN* por qRT-PCR. No se pudieron analizar los niveles de proteína mediante WB por falta de anticuerpo contra FKTN. Durante todo el proceso las células se mantuvieron en el medio conteniendo el antibiótico de selección.

7. Estudios *in silico*

- La búsqueda de secuencias repetidas en el genoma se realizó mediante el programa **RepeatMasker** (<http://www.repeatmasker.org/>).
- La predicción de islas CpG se realizó utilizando los programas informáticos: **CpGPlot** (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>) y **MethPrimer** (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>).
- La identificación de potenciales sitios de unión de factores de transcripción se llevó a cabo mediante los programas: **MatInspector** (<http://www.genomatix.de/products/MatInspector>) y **TFSEARCH** (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).
- Para el alineamiento de secuencias se utilizó el programa de alineamiento múltiple **Clustal W** (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa “GraphPad Prism 5” para MacOSX. La significancia estadística de los resultados se determinó mediante el test-t de Student, y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

1. Caracterización genética y molecular de pacientes con distroglicanopatía

A continuación se van a detallar los resultados de los estudios mutacionales y bioquímicos que se realizaron para la caracterización genética y molecular de los dos pacientes con distroglicanopatía (un paciente MEB y un paciente con LGMD2O) identificados en este trabajo de tesis.

1.1. Análisis del estado de glicosilación del α -distroglicano

1.1.1. Estudios de inmunofluorescencia

Para evaluar el estado de glicosilación del α -DG en estos pacientes se realizaron criosecciones de tejido muscular y se sometieron a análisis inmunohistoquímico empleando los anticuerpos: VIA4-1, anti-laminina y anti- β -DG.

En el caso del paciente MEB se utilizó también el anticuerpo anti- α -DG ($\text{p}\alpha\text{DAG}$), que reconoce una secuencia peptídica del α -DG, y sirvió para corroborar la correcta expresión y localización de la proteína en la membrana sarcoplásmica. La inmunotinción del tejido muscular del paciente MEB, empleando el anticuerpo VIA4-1, reveló una ausencia total de señal, concordante con la falta de O-glicosilación del α -DG (Figura 7A). En cambio, el uso del anticuerpo $\text{p}\alpha\text{DAG}$ permitió detectar el patrón de membrana, lo que indicaba la localización correcta del α -DG en el sarcolema (Figura 7B).

El estudio inmunohistológico con los anticuerpos anti- β -DG y anti-laminina reveló la falta de afectación de estas dos proteínas ya que se mantenía su correcta localización (Figura 7E y F).

Para el paciente LGMD2O, el análisis inmunohistoquímico reveló una tinción anormal del α -DG, con inmunoreactividad clara en algunas de las fibras musculares y débil señal en otras (Figura 8A).

En todos los ensayos de inmunotinción se utilizó como control positivo una biopsia muscular de un individuo sano control.

Antes de que nos fuesen remitidos los dos pacientes, en los hospitales de origen se realizaron estudios inmunohistológicos para descartar la presencia de alteraciones en otras proteínas causantes de distrofias musculares como: distrofina, laminina (merosina), sarcoglicanos, disferlina, caveolina, espectrina, titina, etc.

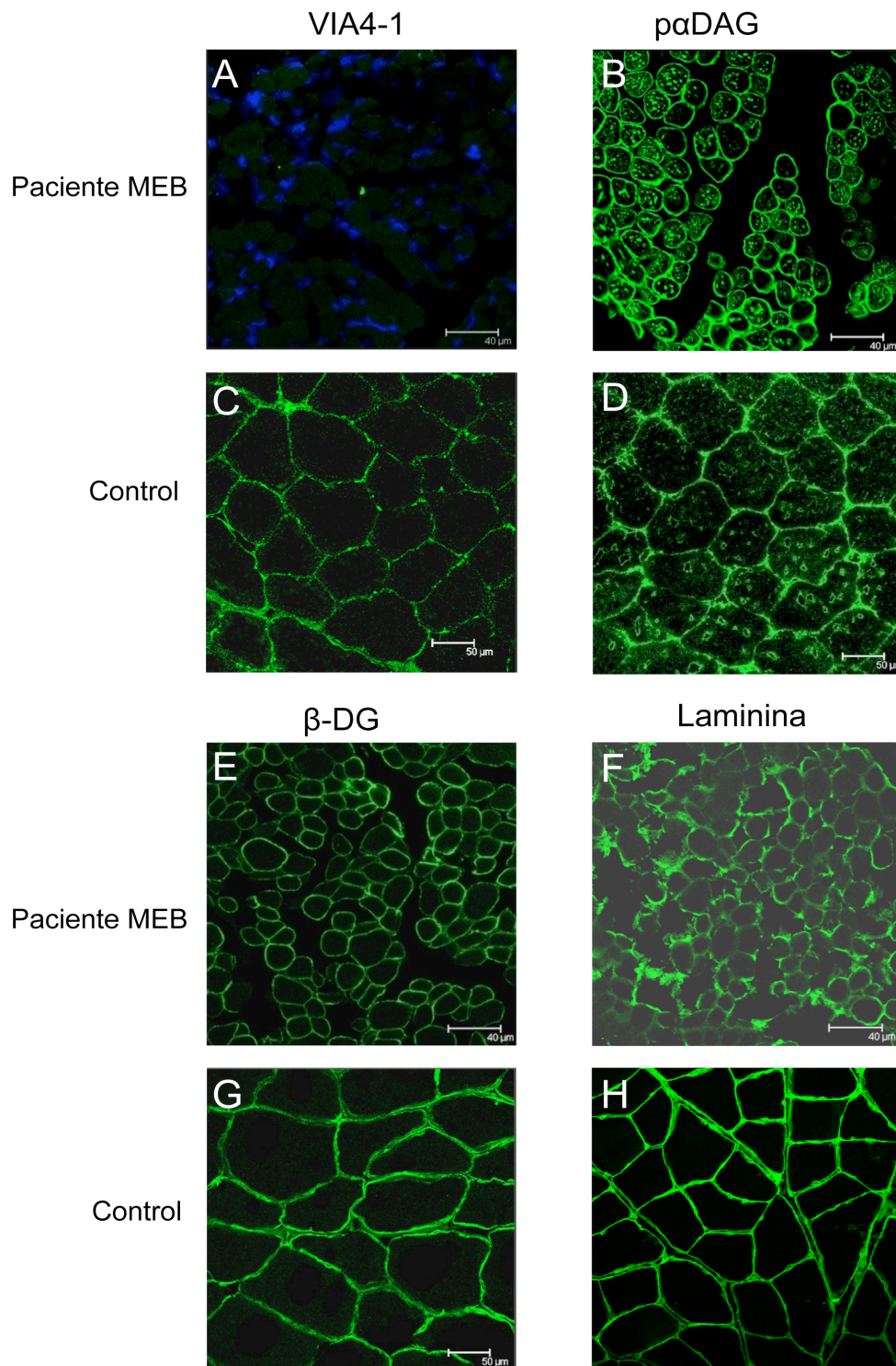


Figura 7. Inmunotinciones fluorescentes sobre el tejido muscular del paciente MEB. (A) Detección del α -DG con el anticuerpo VIA4-1 evidenciando falta de glicosilación del α -DG. (B) Detección correcta del α -DG en el sarcolema del músculo del paciente con el anticuerpo paDAG. (C y D) Inmunotinciones de un tejido muscular control con los anticuerpos VIA4-1 y paDAG. (E) Inmunotinción con el anticuerpo anti- β -DG exhibiendo una localización de membrana correcta, ya que esta proteína no se encuentra afectada en el paciente. (F) Señal positiva tras la inmunotinción con el anticuerpo anti-laminina en el paciente. (G y H) Detección correcta del β -DG y de la laminina en un individuo sano control. Aumento 40x (C, D, G, H) y 63x (A, B, E, F).

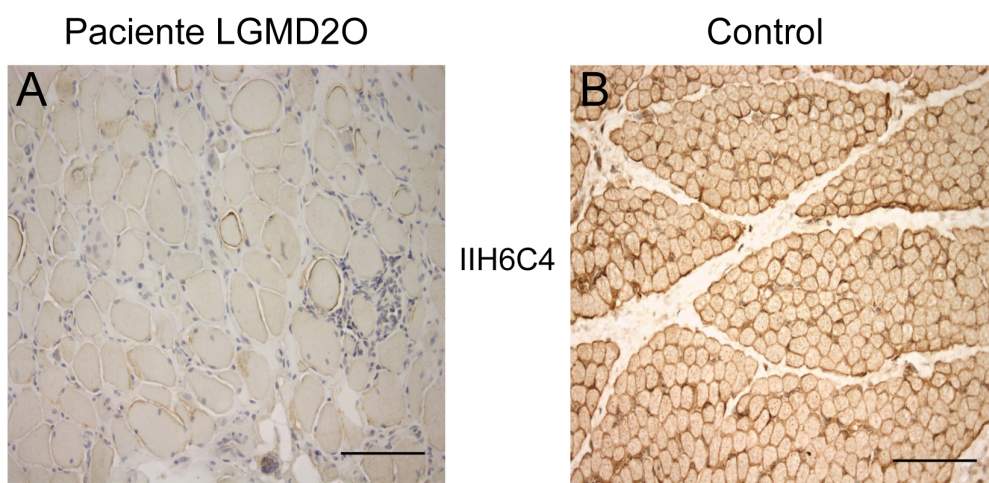


Figura 8. Inmunotinción del α -DG en tejido muscular del paciente LGMD2O. (A) Detección de la glicosilación del α -DG empleando el anticuerpo I1H6C4, con inmunoreactividad clara en algunas de las fibras musculares y débil señal en otras (técnica avidina-biotina). (B) En el músculo control se observa una correcta glicosilación del α -DG con patrón de membrana plasmática. Aumento 20x.

1.1.2. Estudios de Western blot

La ausencia de α -DG glicosilado se confirmó por ensayo de WB mediante el anticuerpo VIA4-1. Este análisis se llevó a cabo utilizando extracto proteico total de músculo congelado del paciente MEB (la biopsia muscular del paciente LGMD2O fue escasa e insuficiente para obtener proteína total).

En la Figura 9 se observa una ausencia de señal en el carril correspondiente al paciente MEB, mientras que en el individuo control se puede observar una banda alrededor de 120-200 kDa que corresponde al α -DG glicosilado.

Para corroborar estos resultados y para demostrar la falta de funcionalidad del α -DG hipoglicosilado, es decir su falta de unión de la subunidad α 2 de la laminina (merosina), se realizó un ensayo de “laminin overlay” que permite evaluar la afinidad de la merosina para el α -DG. Se puede observar una banda amplia de 130-200 kDa correspondiente al α -DG glicosilado del individuo sano control, mientras que en el carril que corresponde al paciente MEB se detectó sólo la laminina propia del tejido muscular representada por una banda fina con un tamaño molecular de 200 kDa.

La subunidad β del DG, con un tamaño molecular de 43 kDa, se detectó correctamente tanto en el individuo sano control como en el paciente MEB y también sirvió como control de carga en el ensayo de WB.

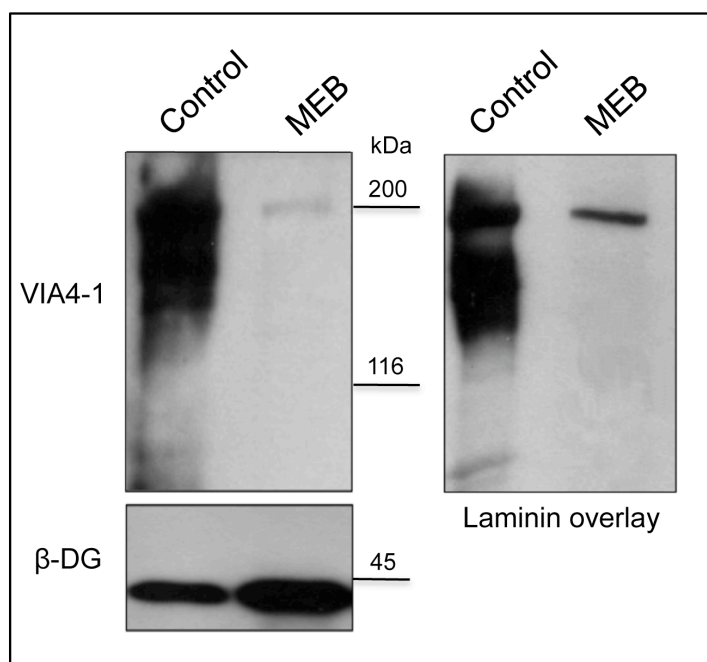


Figura 9. Análisis del estado de glicosilación del α -dístroglicano en el paciente MEB mediante ensayo de Western blot. La detección con el anticuerpo VIA4-1 revela una falta de glicosilación del α -dístroglicano en paciente MEB (panel izquierdo, carril 2 de izquierda a derecha) comparado con el control sano, donde se puede observar una correcta glicosilación del α -dístroglicano reflejada por su peso molecular de alrededor de 130-200 kDa (carril 1). El ensayo de “laminin overlay” confirma la falta de α -DG glicosilado en el paciente y su falta de unión a la laminina, ya que se detecta sólo la laminina propia del tejido (panel derecho, carril 2). La expresión del β -dístroglicano en el paciente es muy similar al control y, al mismo tiempo, demuestra el uso de cantidades equivalentes de proteína para este ensayo (panel izquierdo abajo).

Todos estos resultados confirmaron el diagnóstico de distroglicanopatía de los dos pacientes y permitieron continuar con el estudio mutacional para determinar la causa genética de estas dos patologías.

1.2. Análisis mutacional de los pacientes

En el análisis mutacional se analizaron los exones codificantes, las uniones intrón-exón, las regiones promotoras y las zonas 3' UTR que contienen las secuencias consenso de poliadenilación de los genes: *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN*, *FKRP*, *LARGE* y *DAG1*.

1.2.1. Paciente MEB

El rastreo mutacional permitió la detección de dos mutaciones en heterocigosis en el gen *POMGNT1*. La primera mutación es una transición c.1496G>A que predice la sustitución p.Cys490Tyr en el exón 17 (Figura 10A). Esta mutación ha sido descrita previamente en otros pacientes con distroglicanopatía, y también se detectó en heterocigosis en la madre del paciente.

La otra mutación es una delección de 1 pb, c.1545delC en el exón 18, y genera un cambio en el marco de lectura de los codones, dando lugar a un codón de parada prematuro en la posición 536 de la proteína. El análisis de secuencia del exón 18 en los padres del paciente confirmó que esta mutación se heredó de su padre (Figura 10B).

Las dos mutaciones identificadas se confirmaron también por análisis con endonucleasas de restricción. La enzima de restricción *HpyCH4V* se utilizó para confirmar la mutación p.Cys490Tyr, ya que este cambio elimina uno de los dos sitios de corte de la enzima. La digestión del producto de PCR correspondiente al exón 17 silvestre, con un tamaño de 836 pb, dio lugar a tres fragmentos de 479 pb, 234 pb y 135 pb, respectivamente, mientras que la digestión del fragmento que lleva la mutación generó dos fragmentos de 614 pb y 234 pb, respectivamente (Figura 11A).

La delección del nucleótido 1.545 (c.1545delC) elimina la diana de restricción de la enzima *StuI*. La digestión del producto de PCR correspondiente al exón 18 silvestre, con un tamaño de 415 pb, generó dos fragmentos de 260 pb y 155 pb, mientras que el fragmento que lleva la mutación no sufrió ningún corte ya que la diana de restricción de la enzima *StuI* no estaba presente (Figura 11B).

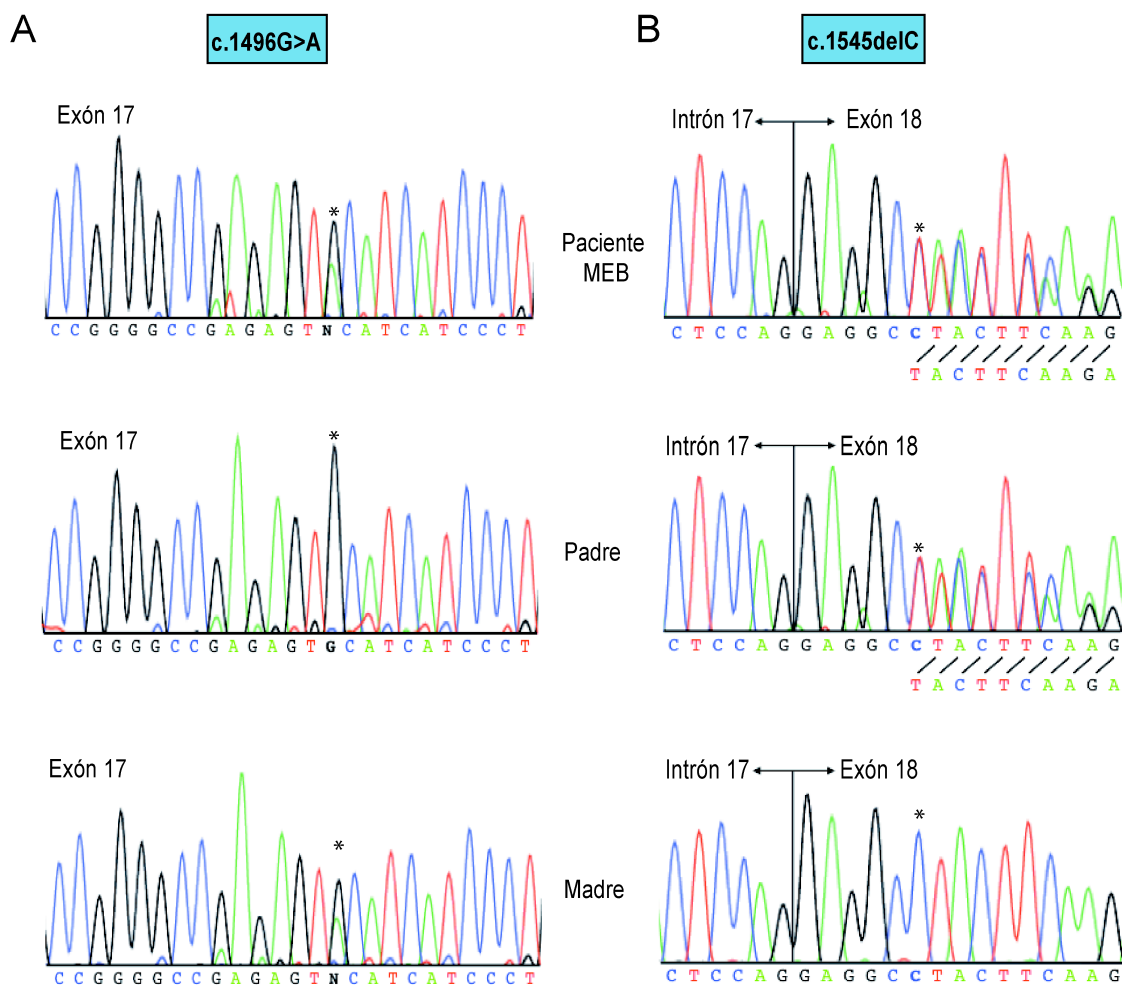


Figura 10. Análisis mutacional del gen *POMGNT1* en el paciente MEB. (A) La primera mutación encontrada es un cambio c.1496G>A que genera una sustitución p.Cys490Tyr. La madre es heterocigota para esta mutación. (B) La segunda mutación es una delección de 1 pb, c.1545delC, que da lugar a un codón de parada prematuro (p.Tyr516Thrfs*21). El padre del paciente es portador de este cambio.

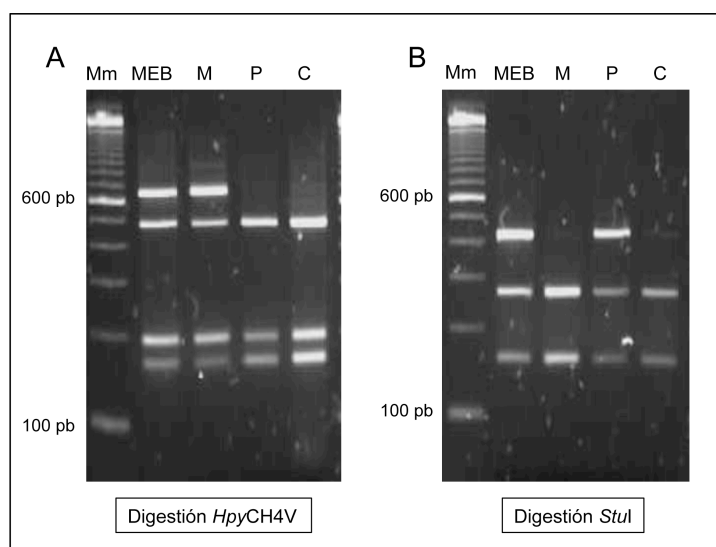


Figura 11. Análisis de endonucleasas de restricción. (A) La variación c.1469G>A se comprobó mediante digestión con la enzima *HpyCH4V*. La mutación elimina uno de los dos sitios de corte presentes en el exón 17 silvestre. (B) Digestión con la enzima *StuI* para comprobar la mutación c.1545delC. Esta mutación elimina el sitio de corte presente en el exón 18 silvestre. (Mm, marcador molecular; MEB, paciente; M, madre; P, padre; C, control sano)

2. Análisis estructural y funcional de la región promotora del gen *POMGNT1* humano

En el presente trabajo se han intentado elucidar los mecanismos moleculares que regulan la expresión del gen *POMGNT1*. Para ello se ha realizado el análisis estructural y funcional de la región promotora del gen *POMGNT1* con el fin de identificar los motivos reguladores y los elementos estructurales que podrían afectar a su expresión.

2.1. Clonación y análisis de la región 5' flanqueante del gen *POMGNT1*

Dado que la glicosiltransferasa *POMGNT1* tiene una expresión ubicua, se ha llevado a cabo la amplificación mediante PCR de una región 5' flanqueante de 2.070 pb del gen *POMGNT1*, utilizando como molde ADNg de un individuo sano purificado a partir de sangre periférica. Esta región contiene un fragmento de 1.426 pb delante del sitio de iniciación de la transcripción (TSS), el exón 1 no codificante (130 pb), el intrón 1 (464 pb) y una región de 50 pb del exón 2 delante del codón de iniciación de la traducción (ATG). El producto de PCR se clonó en el vector pXP2 dando lugar a la construcción denominada pXP2(-1426/+644).

El fragmento de 2.070 pb se sometió a análisis *in silico* utilizando distintos programas bioinformáticos. El uso del programa RepeatMasker permitió identificar varias secuencias repetidas de tipo: LINE/L2, MER5A, MIR, AluSx, que se excluirían como posibles regiones reguladoras, y también repeticiones simples (CCG)_n y (CGG)_n (Figura 13).

Los programas bioinformáticos MatInspector y TFSEARCH se utilizaron para determinar los posibles sitios de unión de factores de transcripción importantes para la regulación de la expresión del gen *POMGNT1*. Algunos de estos de posibles sitios de unión de factores de transcripción se indican en la Figura 13. Se detectaron 5 sitios teóricos de unión de Sp1 (Specificity protein 1) que se hallan distribuidos alrededor del TSS, en las siguientes posiciones: -318/-310, -59/-51, -47/-38, +13/+19 y +28/+34.

Se detectaron dos sitios predichos de unión para el factor Ets-1 (E26-transformation-specific 1) en las posiciones: +2/+8 y +153/+160, y otros dos sitios teóricos de unión para el factor GATA en las posiciones: -212/-205 y +233/241. En la región -82/-74 se detectó la presencia de un sitio predicho de unión para el represor transcripcional ZNF202 (Zinc finger protein 202).

Todos los sitios mostraron un alto coeficiente de similitud con la matriz teórica (matriz generada por el programa informático a partir de sitios de unión presentes en

distintos promotores en los que se ha comprobado la unión de un determinado factor), representado por un valor de puntuación “score” > 0,95 (cuyo valor oscila entre 0 y 1).

El resto de secuencias que se hallaron en el promotor de *POMGNT1* y que presentaban alta similitud con los sitios de unión teóricos fueron: v-Myb (**myeloblastosis viral oncogene homolog avian**), MZF1 (**Myeloid zinc finger 1**), Ik-2 (**Ikaros transcription factor 2**), AML-1A (**Acute myeloid leukemia 1A protein**), NF-κB (**Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells**) y LyF-1 (**Lymphoid transcription factor 1**).

La región analizada carece de cajas consenso de inicio de transcripción tipo TATA (5'-TATAAA-3') y CAAT (5'-GGNCAATCT-3').

El TSS se estableció en base a la secuencia EST BI462048.1, que presenta 16 nucleótidos adicionales por 5' con respecto al primer nucleótido de la secuencia publicada en el GenBank para el gen *POMGNT1* con número de acceso NM_017739.3.

Para la detección de las islas CpG se utilizaron los programas CpG Plot y MethPrimer, que utilizan ciertos parámetros para seleccionar zonas ricas en C y G que se pueden considerar islas CpG. El primer criterio consiste en la presencia de un porcentaje total de nucleótidos G+C superior al 50%. El segundo criterio es la existencia de una relación entre parejas 5'-CG-3' reales, respecto al contenido total G+C, superior al 0,6 (en una escala del 0 al 1). Este hecho se debe al que sólo las citosinas situadas en el extremo 5' de una guanina son utilizadas como sustrato para la metilación por las ADN metilasas. En base a este análisis predictivo se identificó una isla CpG de 440 pb situada en la región -198/+219 en relación con el TSS (Figura 14).

-1426 GGGACATCTT TTCAAATGTA ATAAATGTG TTGGGTTTTC TTCCATTCTT
 ATACATACCTT ACTAGGAAAA ATCATGTATT TCTTTAACTC CTAAGACAAG
 TACTGTAAAC ATTTTCATTTT GGGGGATATT ACCCCACCAT TCAGGAAGCA
 GATGGAATAC AGAAAGCTCA AAAAAATCTA ACTGGTCTTC TGGCTTCCTC
 TGTCTGCTTC CAACCCATTTC TCCACAAAAA AAGTAAAGGT TCTCTTAAAA
 CAGAAATTGG ATTATATTGC TCCCCTGCCT AAAACTGTTC TATGGCTATC
 CACTTCAAAC AAGCATCAAC ATCACCTAGA AACTTCTCAG GAATGCAAAA
 TCCCACCCTG CCCCAGACCA CTGAATCTAA AACTCTAGGG ATGGGGCCCA
 GCACCTCTGT TTTAAGAAGT CATCCAGGTG ATTCTGACGC AAGCTAAAGT

-963 TTGAGAACCA TTCTGTTAAG CTAACCTGCTT TCTATGTATG ATGTTATTTA
 AACCTGGCAA TTCTTATGTA TTGTTGCCAG CAGAGTGCAG TGGTTAAGAG
 CAGAATCTGG AGCTAGGCTG AGTTTCAATT CCACCTCTCC TAGCTTTGTG
 ATATTAGGTC TTATTTCTTT ATCTGCGACA GGGATAGTAA TAGCGCCTAT
 AGCCAGCACG GTGGCTCACT GCCCATAATC CCAGCACCTT GGGAGGCCAA
 GCGGGCGGGA TCACTTGAGG TCAGAAGTTC AAGACCAGCC TGGCCAACAT
 GGTGAAACCC CGTCTCTACT AAAAAATATAA AAATTAGCTG GGTGTGGTGG
 CGCACGACCG TAGTCCCAGC TACTCAGGAG GCTGAGGCAG GAGAATCGCT
 TGAACCCAGA AGGCGGAGGT TGCAGCGAGC CGAGATGGTG CCACTGCACT
 CCAGCCTGGG CGACAGAGCG AGACTCCGTC TCAATTAAAA AAAAAACAAT
 AATAATGATA ATAGCGCCTA CCTCATGGGG TTGTTGTGGA ATTAAACATC

-402 ATCAGTAAGG TGCTTAGAAC AGTACAGAA CCTGGATTTT AATCTCCCTT
 GGCTTCCAAT AGCTGTGCAT GCCCAGGAC TAGGTAACGG CCTTGCCAG
 GACGGGTATG GGGCGGGTGG TGTGTGCCCT GTGTCCAAGG GTTGCAGCCC
 CTCTGACCCT GGCGTGCCCT GTGATCTGGT CCAAGGTGCT AGGCTCTGA
 CTGGAGTCGG GCTTGCCATC GCGGTGCTG GGGAGCGGGC TGCTCTCGTG
 CAGGCGCCC CACCAGCCAG CCGGGCTGCG AAGCTGCCTA GCACGGTCTG
 AGCATTCGCC TTAATCGCTG GCTGCTTACA CCCCAGCGCC GCTTCCGCTA
 GCGGCCCGC GCGGCCCGC GCGCTAAGCA CCGCCGTCG CCCTCTCACC
 CCGCGGCAGC GCGCGCGGCG GCGGCGCGG AAGCGGGGG GCGGGCCAGG
 CCGGGCGGCG GCGGCAAGCG GCATGGAGGA GCGGAGGCC GCGGCGAGCC
 GGGCCGAGCA GTGAGGGCCC TAGCGGGGCC CGAGCGGGGC CCGGGGCCCC
 TAAGCCGTGA GTGCCTCCGC GTGGGTGTC GGAACGGGTA GCGCTGCCCG
 TGCAGGTCTC CTGAGCCCTC GGGCGGCTCC GGGCCCTGGG AGGAGGAGAG
 AAGCTGGGGC AGATAGGATG GGACGAGGGT TGAAGACTGG GGCAGGAGAG
 GTCGCTCTTT GCTCACCACA GGCTTGGGAA GGCCTGGAAC TTGGTCTTTG
 TAGGGGCTAA CGAACTTTGA GCCGATTATT TGGCTCCAC CCTTGGACAG
 CCTTGATTCA GAGAGTTACT CCAGTCTCAG GGAATTTCCA GGTGATCCAA
 CCCCAGTAA GGGTTTCTCG CCAGCCGAGA GAAGTTGAGC CACTTTCCCC
 ATGTCACACA GTATGGGTGC TTGCAGGGAA GAGTTGCTGG GAGGTCTCTC
 CTCATCTCCC CAGAAGGCAT CAGACTTTGG GAGGAGCATC TTACCCCATG
 TGGCCCTCTG GTCCCTTCAG ATTCCTGAAG TCATGGGCTG GCCAGGACAT
 +644 TGGTGACCCG CCAATCCGGT ATG

Figura 13. Secuencia nucleotídica y representación esquemática de la región 5' flanqueante del gen *POMGNT1*. Se marcan con colores las secuencias repetidas identificadas mediante el programa Repeat-Masker: LINE/L2 (azul celeste), MER5A (naranja), MIR (rosa), AluSx (verde), repetición simple (CCG)_n (marrón) y repetición simple (CGG)_n (morado). Los exones se muestran en rojo. El sitio de inicio de la transcripción se indica con +1 y con recuadro. Los posibles sitios de unión de factores de transcripción correspondientes a la región promotora -492/+644, se encuentran subrayados. Los sitios de corte para la generación de los distintos fragmentos de delección del promotor se marcan en negrita y en color negro, y las posiciones con números que se indican en la parte izquierda de la imagen. Las delimitaciones de la isla CpG de 440 pb se marcan con flechas. La mutación -83_-75dup encontrada en el paciente LGMD2O se marca en verde.

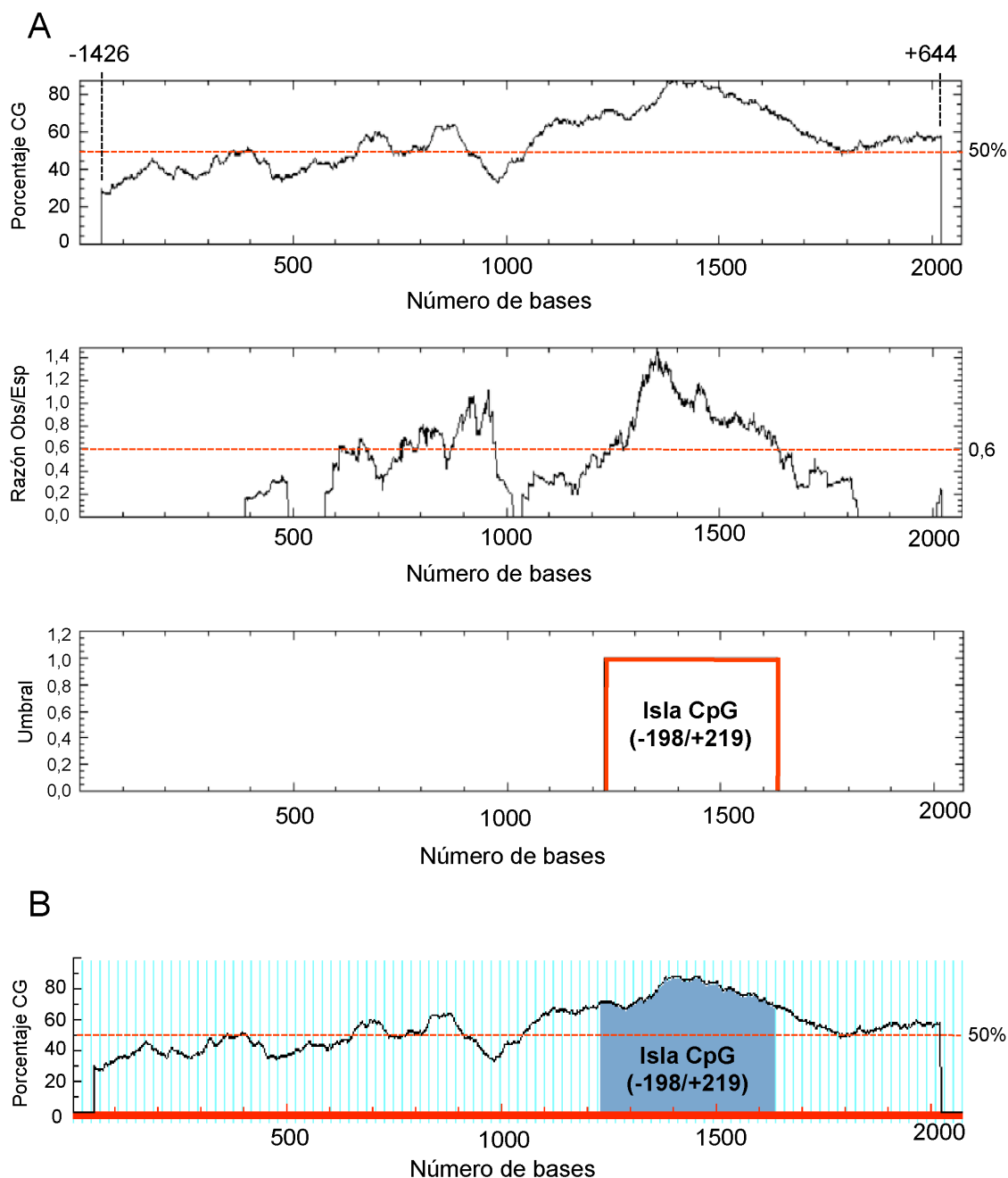


Figura 14. Detección de la isla CpG en el promotor de *POMGNT1*. (A) Programa CpG Plot. Representación esquemática de la presencia de residuos de C (citosa) y G (guanina) en la región -1426/+644 del promotor de *POMGNT1*. El contenido de GC se muestra como porcentaje de residuos G+C respecto al total de residuos en la región (primer panel). En el segundo panel se indica la presencia de dinucleótidos CG susceptibles a ser metilados en el promotor de *POMGNT1*. Se considera que una región contiene nucleótidos susceptibles a ser metilados cuando la relación entre los residuos CG reales (observados) y el total de residuos esperados es superior a 0,6. (B) Programa MethPrimer. Representación esquemática de la presencia de residuos de C y G en la región -1426/+644 del promotor de *POMGNT1*. El contenido de GC se muestra como porcentaje de residuos G+C respecto la total de residuos en la región. Las islas CpG se sitúan en zonas cuyo porcentaje de C+G es >50% y la razón Obs/Esp es >0,6. La isla CpG detectada se posiciona en la región -198/+219.

2.2. Caracterización funcional de la región promotora de *POMGNT1*

Para identificar los elementos estructurales reguladores esenciales para la regulación de la actividad promotora del gen *POMGNT1*, se generaron una serie de construcciones mediante delecciones sucesivas tanto desde el extremo 5' como desde el extremo 3' de la región analizada de 2.070 pb del gen *POMGNT1* (Figura 15).

Los fragmentos con extremos 5' que variaban desde la posición -1426 hasta la posición -52, así como con extremos 3' que se situaban entre las posiciones +644 hasta +25 se generaron por PCR utilizando como molde la construcción pXP2(-1426/+644), y se clonaron en el vector pXP2. Todas las construcciones junto con el vector pXP2 vacío (control negativo) y la construcción HSVtk-pXP2 (control positivo) se transfectaron transitoriamente en células COS7. También se co-transfectó el plásmido pSV- β -Gal que sirvió de control interno de la transfección.

Como se puede observar en la Figura 15, de todas las construcciones, el plásmido pXP2(-402/+644) fue el que presentó el nivel máximo de actividad luciferasa. Cuando el extremo 5' se extendió desde la posición -402 pb hasta la posición -963 pb se observó una ligera bajada de la actividad luciferasa.

La extensión de la secuencia 5' desde la posición -402 pb hasta la posición -1.426 pb, generó una bajada del 50% de la actividad luciferasa de la construcción (pXP2-1426/+644) comparado con la construcción pXP2(-402/+644), lo que sugiere la presencia de una actividad supresora en esta región 5' flanqueante distal.

La delección de la secuencia localizada entre las posiciones -402 pb y -52 pb generó un descenso de la actividad luciferasa de aproximadamente el 45% de la construcción pXP2(-52/+644), indicando la presencia de un posible elemento regulador importante para la actividad promotora en la región -402/-52. Los resultados de búsqueda de posibles factores de transcripción mediante los programas anteriormente mencionados indicaron la presencia de un posible sitio de unión para el factor de transcripción Sp1 (Sp1 sitio1) (Figura 13). Otros posibles elementos reguladores se detectaron mediante delecciones seriadas desde el extremo 3' de la región analizada.

Una bajada significativa de la actividad promotora de aproximadamente el 80% se obtuvo eliminando la región +148/+644, que contenía un sitio de unión predicho para un factor de transcripción de la familia GATA (GATA sitio 2). A continuación, la eliminación de la región +25/+148 generó un descenso de alrededor del 90% de la actividad luciferasa de las construcciones pXP2(-402/+25) y pXP2(-1426/+25).

El fragmento delecionado contiene un sitio de unión predicho para el factor Sp1 (Sp1 sitio 5) y parece ser crítico para la actividad promotora del gen *POMGNT1*.

Otros posibles elementos reguladores detectados mediante los programas MatInspector y TFSEARCH se situaban en la región +4/+20 y consistían en sitios de reconocimiento para Sp1 (Sp1 sitio 4) y Ets-1 (Ets-1 sitio 1) (Figura 13).

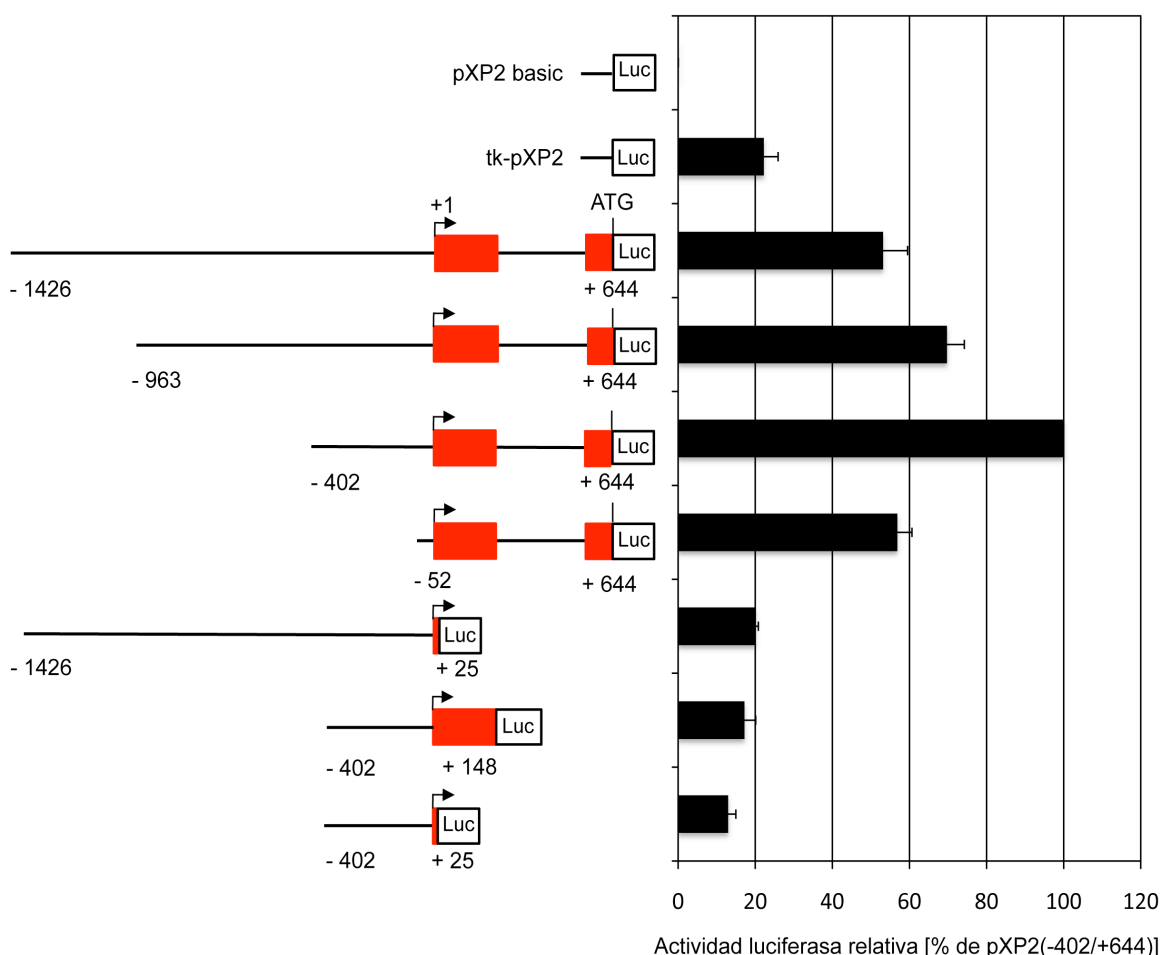


Figura 15. Análisis de la actividad luciferasa de la región 5' flanqueante del gen *POMGNT1*. Los distintos fragmentos del promotor de *POMGNT1* se insertaron en el vector pXP2 y se transfectaron transitoriamente en células COS7. En la parte izquierda de la figura se representan esquemáticamente las construcciones empleadas en el ensayo: pXP2(-1426/+644), pXP2(-963/+644), pXP2(-402/+644), pXP2(-52/+644), pXP2(-1426/+25), pXP2(-402/+148), pXP2(-402/+25). Como controles del ensayo se emplearon los vectores pXP2 (control negativo) y tk-pXP2 (control positivo). La actividad luciferasa de las distintas construcciones empleadas se muestra en comparación con la actividad de la construcción pXP2(-402/+644) a la que se le dio el valor del 100%. El análisis se realizó por triplicado y en tres ensayos independientes.

2.3. Detección de los factores de transcripción que regulan la expresión del gen *POMGNT1*

2.3.1 Ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA)

Los experimentos realizados empleando las construcciones con el gen de la luciferasa permitieron identificar las secuencias que controlan la actividad promotora del gen *POMGNT1*. Ya que la región promotora -402/+644 presentó el mayor nivel de actividad luciferasa se quiso comprobar si los factores de transcripción predichos eran capaces de reconocer y unirse específicamente a las secuencias presentes dentro de esta región. Para ello se realizaron ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA), utilizando extractos nucleares de células COS7 y sondas marcadas radiactivamente que contenían los sitios de unión de los factores de transcripción: v-Myb, MZF1, Sp1, GATA-1, -2 y -3, Ets-1, AML-1a, NF-kB/c-Rel y Lyf-1.

A continuación se van a presentar sólo los resultados de los ensayos EMSA que detectaron una clara unión de los factores de transcripción Sp1, Ets-1 y GATA en la región analizada. Todas las sondas empleadas tanto silvestres como mutadas se encuentran detalladas en la Tabla 8. Las sondas mutadas se diseñaron y se utilizaron para confirmar la especificidad de la unión.

Como se puede ver en la Figura 16, cuando se utilizaron las sondas silvestres que contenían los sitios de unión para Sp1 (Sp1 sitio 1 WT, situado en la región -318/+310; Sp1 sitio 4 WT, situado en la región +13/+19; Sp1 sitio 5 WT, situado en la región +28/+34), para Ets-1 (Ets-1 sitio 1 WT, situado en la región +2/+8) y para GATA (GATA sitio 2 WT, situado en la región +233/241) se detectó una banda de retardo debido al reconocimiento de cada una de las sondas para la proteína correspondiente (carril 2). La formación de estos complejos se vio inhibida al añadir un exceso de oligonucleótido silvestre frío (carril 3), pero no al realizar la competición con la sonda mutada fría (carril 4), lo que demuestra la especificidad de la unión ADN-proteína, descartando la existencia de complejos inespecíficos.

Ningún complejo ADN-proteína se detectó al incubar las sondas mutadas (Sp1 sitio 1 Mut, Sp1 sitio 4 Mut, Sp1 sitio 5 Mut, Ets-1 sitio 1 Mut y GATA sitio 2 Mut) (Figura 17) con extractos nucleares de células COS7 (carril 2), y tampoco se detectaron bandas de retardo en los ensayos de competición con las sondas frías tanto silvestres (carril 3) como mutadas (carril 4), demostrando la especificidad de las uniones *in vitro* de los factores Sp1, Ets-1 y GATA.

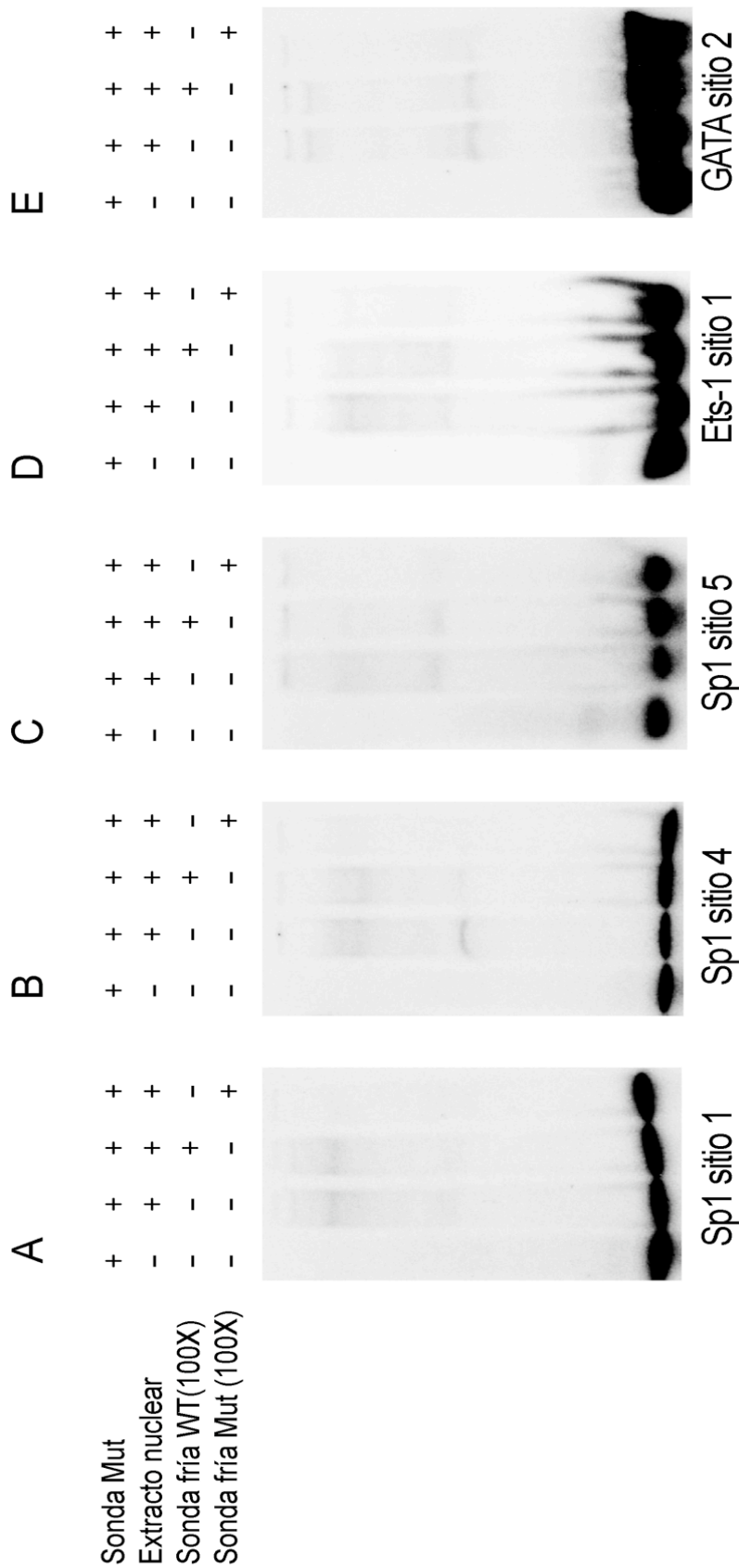


Figura 17. Confirmación de la especificidad de unión de los factores Sp1, Ets-1 y GATA mediante ensayo de EMSA. Se emplearon sondas marcadas radiactivamente con ³²P que contienen mutaciones específicas en los potenciales sitios de unión: Sp1 sitio 1 (A), Sp1 sitio 4 (B), Sp1 sitio 5 (C), Ets-1 sitio 1 (D) y GATA sitio 2 (E). En todos los casos se observa la falta de complejos ADN-proteína tras la incubación de las sondas con los extractos nucleares de COS7.

2.3.2 Ensayos de super-retardo en la movilidad electroforética (Supershift)

La identificación de la proteína Sp1 en los complejos ADN-proteína generados tras la incubación de las sondas: Sp1 sitio 1 WT, Sp1 sitio 4 WT y Sp1 sitio 5 WT con extractos nucleares de células COS7 se realizó mediante ensayos de super-retardo en gel utilizando el anticuerpo anti-Sp-1. Como se puede observar en la Figura 18, los complejos de retardo formados tras la incubación de las sondas Sp1 silvestres con extractos nucleares (carril 2) desaparecieron totalmente al añadir el anticuerpo anti-Sp1 (carril 3), confirmando de esta manera la unión *in vitro* del factor Sp1 a las tres regiones analizadas. La especificidad de la detección se demostró mediante el uso de un suero control de ratón (carril 4), ya que su adición no afectó la formación de los complejos ADN-proteína.

La unión de los factores de transcripción Ets-1 y GATA no se pudo corroborar mediante ensayo de super-retardo en gel ya que no se disponía de los anticuerpos necesarios.

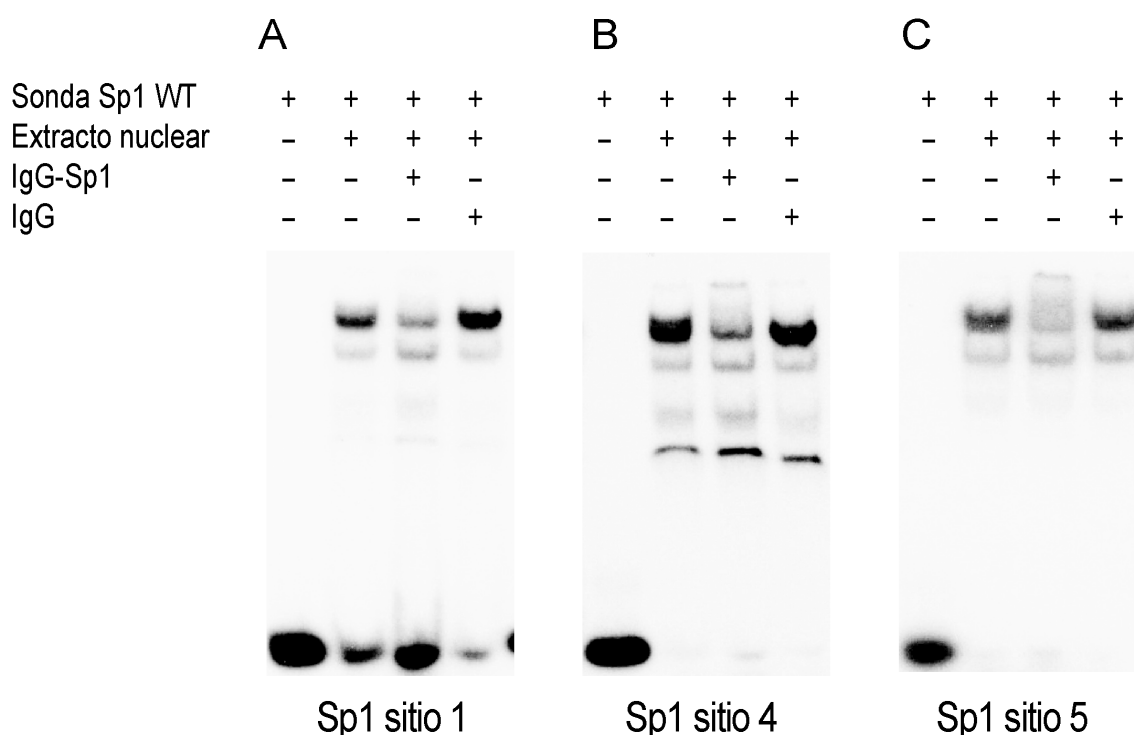


Figura 18. Ensayo de super-retardo en gel. Las sondas silvestres marcadas radiactivamente con ^{32}P , que contienen los potenciales sitios de unión: Sp1 sitio 1 (A), Sp1 sitio 4 (B) y Sp1 sitio 5 (C) se incubaron con extractos nucleares de células COS7. El primer carril de cada panel representa la sonda marcada sin extracto nuclear (control negativo). El segundo carril indica los complejos generados ADN-proteína, y cuya formación está inhibida por la adición del anticuerpo anti-Sp1 (carril 3), pero no por la adición de un suero control de ratón (carril 4).

2.3.3. *Sp1 se une in vivo al promotor de POMGNT1 en células COS7. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)*

Los ensayos de retardo (EMSA) y super-retardo en gel indicaron la capacidad del factor de transcripción Sp1 para reconocer *in vitro* las secuencias consenso: -318/+310, +13/+19 y +28/+34 presentes en el promotor de *POMGNT1*. Sin embargo, es esencial comprobar, si en condiciones celulares, Sp1 se une *in vivo* al promotor.

Para estudiar la posible unión del factor de transcripción Sp1 endógeno al promotor de *POMGNT1* en células COS7 se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina. Se generó la unión covalente entre el ADN y las proteínas que están interaccionando con él en la cromatina, seguido de la fragmentación del ADN mediante sonicación, optimizada para la obtención de fragmentos de cromatina de entre 300 y 1.000 pb. La inmunoprecipitación de la cromatina que lleva unida la proteína Sp1 se llevó a cabo añadiendo el anticuerpo anti-Sp1. El ADN purificado tras la inmunoprecipitación con este anticuerpo se utilizó como molde en reacciones de PCR, empleando los oligonucleótidos (Tabla 7) diseñados para amplificar las regiones que contienen los tres sitios de unión de Sp1 (Sp1 sitio 1, Sp1 sitio 4 y Sp1 sitio 5).

Los sitios de unión 4 y 5 están localizados en la región promotora +13/+34, y se amplificaron conjuntamente dada su proximidad en el genoma. Como se puede observar en la Figura 19, los fragmentos amplificados mediante PCR tenían los tamaños esperados: de 111 pb para la región que contiene el sitio 1, y de 143 pb para la región que contiene los sitios 4 y 5 de unión de Sp1. La especificidad de la interacción de Sp1 con el promotor de *POMGNT1* se demostró mediante la amplificación de un fragmento de la región codificante del gen *GAPDH* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), ya que el factor Sp1 no se une a esta zona.

Los dos fragmentos que contienen los sitios de unión de Sp1 junto con un fragmento de 144 pb, que corresponde a una región codificante del gen *GAPDH*, se amplificaron al utilizar como molde el material de partida (“input”) (ADN sonificado y sin inmunoprecipitar). La reacción demostró ser específica, ya que no se obtuvo ningún producto de PCR cuando no se utilizaron anticuerpos en la inmunoprecipitación o cuando se utilizó el anticuerpo inespecífico anti-FLAG.

Todos estos datos indican que el factor de transcripción Sp1 se une al promotor de *POMGNT1* de células COS7 *in vivo*.

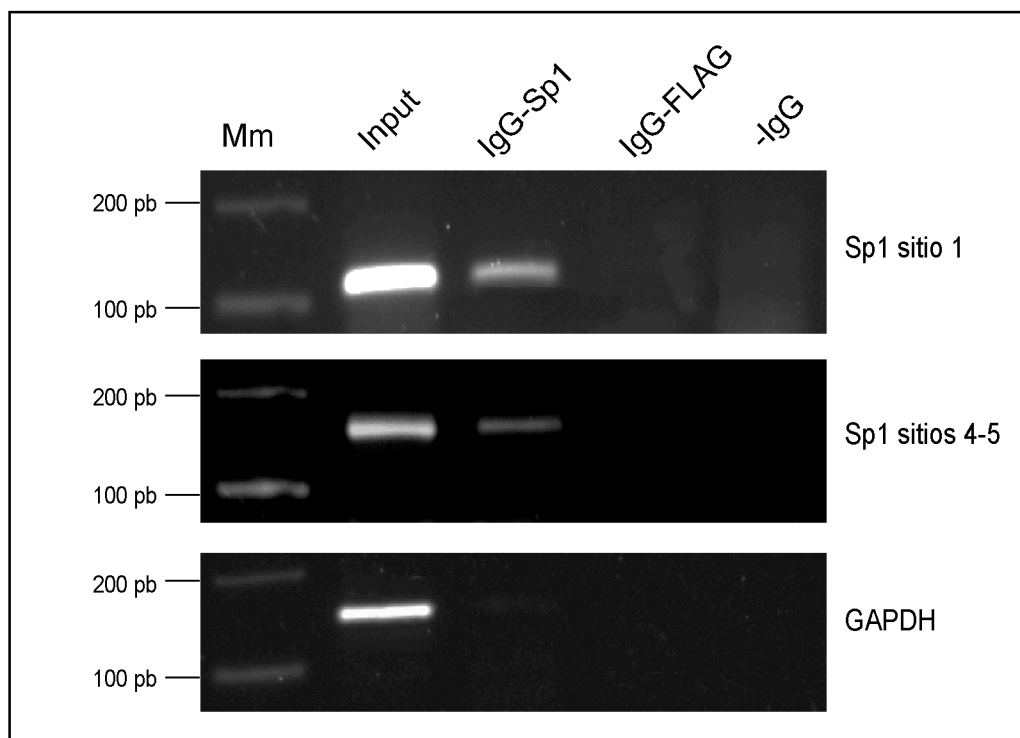


Figura 19. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina de Sp1 en el promotor de *POMGNT1*. La cromatina sonicada fue inmunoprecipitada tanto con el anticuerpo anti-Sp1 (carril 3) como con el anticuerpo inespecífico anti-FLAG (carril 4) o sin anticuerpo (carril 5). Como control negativo se utilizó un fragmento de la región codificante del gen *GAPDH*. Se pueden observar las bandas de 111 pb y 143 pb que corresponden a las regiones que contienen los sitios de unión del factor Sp1 presentes en el promotor de *POMGNT1*. Mm, marcador de peso molecular de ADN de 100 pb.

Dado que los estudios de caracterización funcional del promotor de *POMGNT1* humano se realizaron en un entorno celular de COS7 (fibroblastos de riñón del mono verde africano, *Chlorocebus aethiops*, cuyo genoma aún no ha sido secuenciado) se quiso evaluar la conservación de los sitios de unión de Sp1, Ets-1 y GATA humanos en el promotor de *POMGNT1* de *Macaca mulatta* (otro cercopiteco muy relacionado con *C. aethiops*).

El análisis de alineamiento múltiple empleando el programa informático Clustal W reveló un alto grado de conservación de estos sitios entre humano y macaca (Figura 20).

Como el sitio 1 de unión de Sp1 del promotor de *POMGNT1* de *M. mulatta* presentaba un cambio C>A comparado con la secuencia humana, se llevó a cabo la amplificación de esta región utilizando ADN procedente de células COS7 y se observó la presencia de este cambio en forma heterocigota, indicando que Sp1 se podría unir a cualquiera de los dos motivos (5'-GGGC/AG-3').

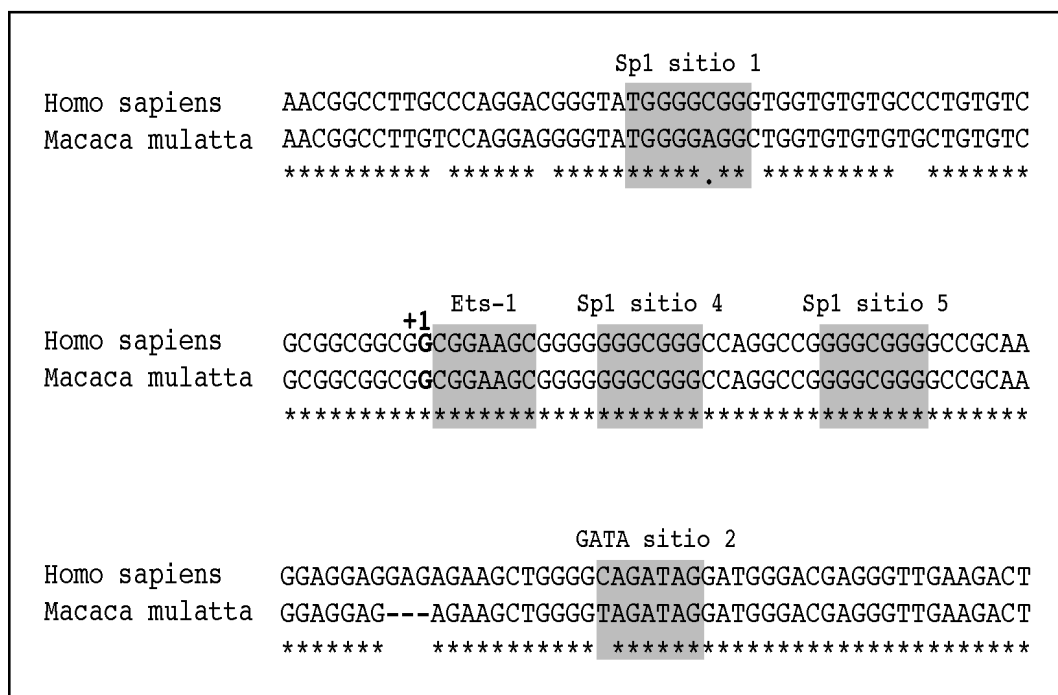


Figura 20. Comparación de las secuencias promotoras de *POMGNT1* de *H. sapiens* y *M. mulatta* que contienen los sitios de unión de los factores de transcripción Sp1 (sitios 1, 4 y 5), Ets-1 (sitio 1) y GATA (sitio 2). El sitio de iniciación de la transcripción se indica con +1. Los sitios de unión de factores de transcripción altamente conservados se encuentran sombreados.

2.4. Caracterización funcional de la mutación presente en el paciente LGMD2O

2.4.1. Clonación del promotor de *POMGNT1* mutado

Después de la identificación y caracterización funcional del promotor proximal de *POMGNT1* se comprobó si la mutación -83_-75dup, encontrada en el paciente LGMD2O, era responsable del fenotipo presentado.

Para la caracterización funcional de la mutación presente en el promotor de *POMGNT1* se amplificó la región promotora -402/+644 que contenía la mutación, utilizando ADNg purificado a partir de una muestra de sangre del paciente. El producto de PCR se clonó en el vector pXP2, dando lugar a la construcción pXP2(-402/+644Mut). También se generó una construcción adicional del promotor del paciente que consistía en la región -1426/+644 portadora de la mutación -83_-75dup, y que se denominó pXP2(-1426/+644Mut). Las dos construcciones que llevaban la mutación, junto con las construcciones silvestres pXP2(-402/+644) y pXP2(-1426/+644), se transfectaron transitoriamente en células COS7 y HEK293T. Como control interno de transfección se utilizó el vector pSV-β-Gal.

2.4.2. El promotor del gen *POMGNT1* mutado inhibe significativamente su expresión

Las medidas de la actividad luciferasa, utilizando lisados proteicos de células COS7 y HEK293T transfectadas con las construcciones pXP2(-402/+644) y pXP2(-402/+644Mut), revelaron una bajada de alrededor del 75% de la actividad luciferasa del promotor mutado comparado con el silvestre. El resultado fue similar en las dos líneas celulares empleadas descartando la existencia de una regulación transcripcional específica de línea celular (Figura 21A). Así mismo, como se puede ver en la Figura 21B, un resultado similar se obtuvo al emplear la construcción pXP2(-1426/+644Mut), sugiriendo que la mutación -83_-75dup, encontrada en el promotor de *POMGNT1* del paciente LGMD2O, disminuye de manera significativa la actividad promotora del gen.

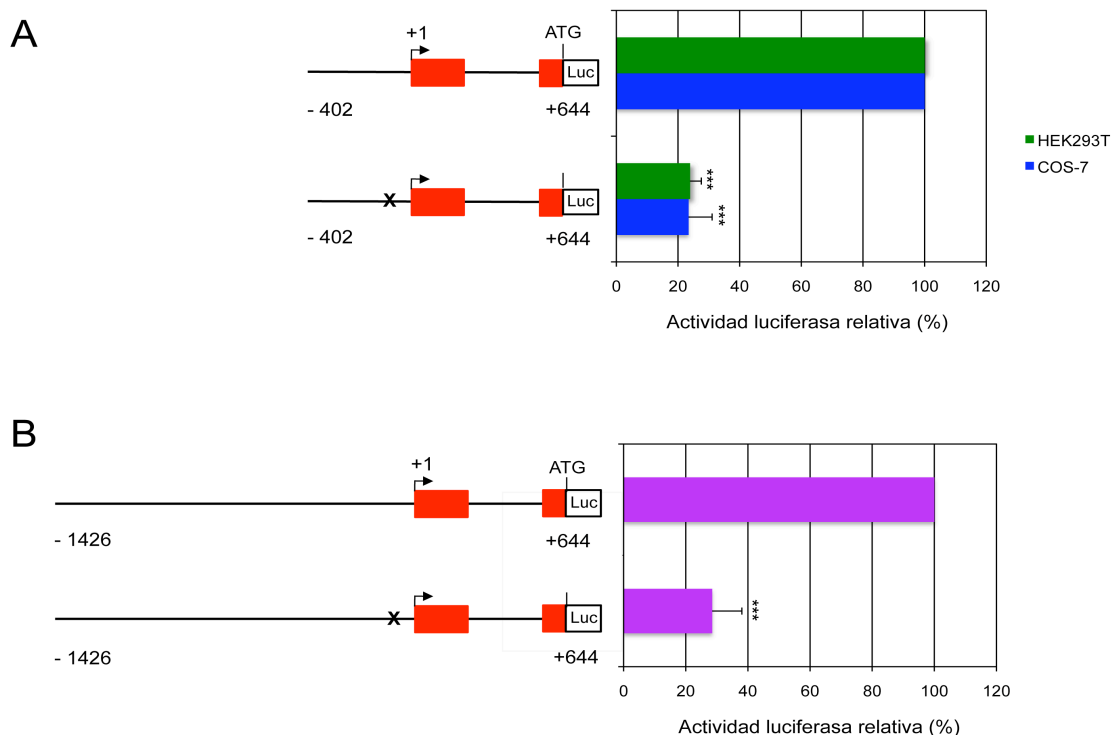


Figura 21. Análisis de la actividad luciferasa del promotor de *POMGNT1* del paciente LGMD2O. (A) La región promotora -402/+644 que lleva la mutación -83_-75dup se clonó en el vector pXP2, y junto con la construcción silvestre se transfectó transitoriamente en células COS7 y HEK293T. La actividad luciferasa de la construcción que lleva la mutación pXP2(-402/+644Mut) se muestra en comparación con la actividad de la construcción silvestre pXP2(-402/+644). (B) La región promotora -1426/+644 que lleva la mutación -83_-75dup se clonó en el vector pXP2, y junto con la construcción silvestre se transfectaron transitoriamente en células COS7. La actividad luciferasa de la construcción que lleva la mutación pXP2(-1426/+644Mut) se muestra en comparación con la actividad de la construcción silvestre pXP2(-1426/+644) a la que se le dio un valor del 100%. Los análisis se realizaron por triplicado y en tres ensayos independientes. La mutación -83_-75dup se indica con “x” y el sitio de iniciación de la transcripción con +1. Tres asteriscos (***) indican una $p < 0,0001$.

2.4.3. El represor transcripcional ZNF202 se une al promotor de *POMGNT1* mutado

Dada la bajada de la actividad luciferasa del promotor de *POMGNT1* del paciente LGMD2O se realizó la reevaluación de los resultados del análisis *in silico* para la predicción de sitios de unión de factores de transcripción.

Sorprendentemente se identificó la presencia de un sitio predicho de unión para el represor transcripcional ZNF202 dentro del promotor silvestre, en la región -82/-74, y que correspondía a la región que se encontraba duplicada en el paciente (Figura 13).

La duplicación generaba un segundo sitio de unión para este factor, lo que sugería una mayor represión transcripcional en el paciente debido a la presencia de dos potenciales sitios de reconocimiento para este represor. Para confirmar esta hipótesis deducida del análisis *in silico*, se llevó a cabo un ensayo de EMSA utilizando las siguientes sondas: ZNF202WT (que contiene el sitio predicho de unión de ZNF202), ZNF202Mut (que contiene una alteración en el sitio predicho de unión) y ZNF202Dup (que contiene la duplicación de 9 pb, y en consecuencia dos sitios predichos de unión de ZNF202). Las secuencias detalladas de las sondas utilizadas se indican en la Tabla 8.

Como se puede observar en la Figura 22, los complejos ADN-proteína sólo se detectaron al incubar los extractos nucleares de COS7 con la sonda ZNF202Dup (Figura 22A, carril 3), mientras que ningún complejo de retardo se detectó al emplear las sondas ZNF202WT o ZNF202Mut marcadas radiactivamente (carriles 2 y 4, respectivamente).

El ensayo de EMSA, empleando la sonda silvestre ZNF202WT marcada radiactivamente (Figura 22B), confirmó la falta de formación de complejos ADN-proteína, tanto en presencia de un exceso de la misma (carril 1) como en presencia de un exceso de las sondas frías ZNF202Dup (carril 2) o ZNF202Mut (carril 3).

Los formación de los complejos de retardo tras la incubación de la sonda ZNF202Dup marcada radiactivamente con extractos proteicos no se vio afectada al competir con un exceso de sonda silvestre fría ZNF202WT (Figura 22C, carril 1) o sonda mutada fría ZNF202Mut (carril 3), lo que demostró la falta de afinidad de este represor transcripcional para el promotor silvestre o mutado.

En cambio, la competición con un exceso de sonda ZNF202Dup fría inhibió la formación de los complejos de retardo debido a la fuerte asociación del promotor mutado con el factor ZNF202 (carril 2).

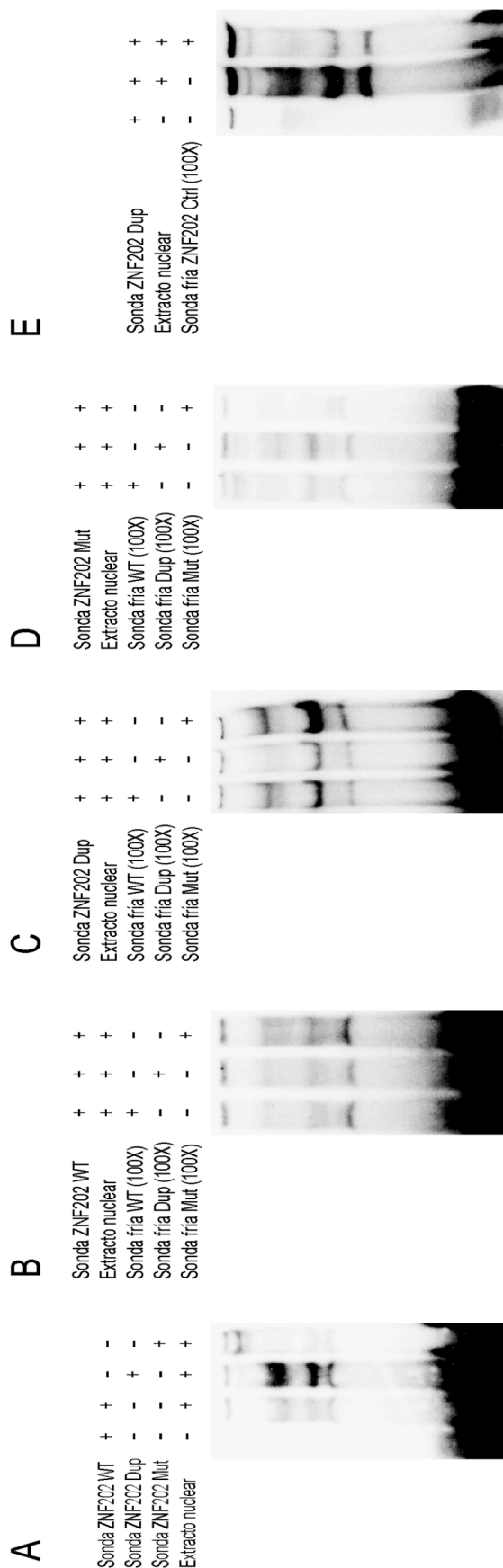


Figura 22. Ensayo de EMSA que demuestra la unión del represor transcripcional ZNF202 al promotor de *POMGNT1* del paciente LGMD20. El (A) Incubación de las sondas ZNF202WT (carril 2), ZNF202Dup (carril 3) y ZNF202Mut (carril 4) con extractos nucleares de células COS7. El primer carril representa la sonda silvestre ZNF202WT sin incubar con extracto nuclear. Los extractos nucleares se unen a la sonda que lleva la mutación -83 -75dup (carril 3), pero no a la sonda silvestre (carril 2) o mutada (carril 4). (B) Competición de la sonda silvestre ZNF202WT con un exceso de las sondas frías: ZNF202WT (carril 1), ZNF202Dup (carril 2) y ZNF202Mut (carril 3). No se detectan complejos de retardo en ninguno de los casos, confirmando la falta de unión del represor al promotor silvestre. (C) Competición de la sonda ZNF202Dup con un exceso de las sondas frías: ZNF202WT, ZNF202Dup y ZNF202Mut. La competición con las sondas frías ZNF202WT (carril 1) y ZNF202Mut (carril 3) no inhibe la formación de los complejos de retardo, mientras que la adición de un exceso de la sonda fría ZNF202Dup bloquea la formación de estos complejos (carril 2). (D) Competición de la sonda mutada ZNF202Mut con un exceso de las sondas frías ZNF202WT (carril 1), ZNF202Dup (carril 2) y ZNF202Mut (carril 3). No se detectan complejos de retardo en ninguno de los casos, confirmando la especificidad de unión del represor al promotor mutado. (E) Competición de la sonda ZNF202Dup con un exceso de sonda control fría ZNF202Ctrl. La incubación de la sonda ZNF202Dup con extractos nucleares da lugar a la formación de complejos de retardo (carril 2), mientras que la adición de un exceso de sonda fría control ZNF202Ctrl inhibe la formación de estos complejos (carril 3).

La competición de la sonda mutada ZNF202Mut no generó ningún complejo de retardo, tanto en presencia de un exceso de sonda silvestre fría ZNF202WT o de sonda fría ZNF202Dup (Figura 22D, carriles 1 y 2 respectivamente), como en presencia de un exceso de la misma (carril 3).

No fue posible realizar ensayos ni de super-retardo en gel ni de ChIP para identificar directamente al represor transcripcional ZNF202 como componente del complejo proteico que se hallaba unido al promotor mutado debido a la falta de anticuerpos comerciales específicos para esta proteína.

En cambio, para confirmar su unión *in vitro* al promotor mutado, en concreto a la región que contiene la mutación -83_-75dup, se llevó a cabo un ensayo de EMSA utilizando una sonda descrita previamente, que contiene la secuencia consenso de unión de ZNF202 presente en el promotor del gen *CRABP2* (*proteína de unión al ácido retinoico tipo 2*) (Wagner et al., 2000) (ZNF202Ctrl, Tabla 8). La incubación de la sonda ZNF202Dup marcada radiactivamente con los extractos nucleares de COS7 determinó la formación de una banda de retardo (Figura 22E, carril 2), mientras que la competición con un exceso de sonda control fría (ZNF202 Ctrl) inhibió la formación de los complejos ADN-proteína, poniendo de manifiesto la presencia del represor ZNF202 en estos complejos (carril 3).

Ya que la unión *in vitro* de los factores de transcripción Ets-1 y GATA al promotor de *POMGNT1*, detectada mediante ensayos de EMSA, no se pudo confirmar mediante ensayos de ChIP, se llevó a cabo un ensayo de RT-PCR para analizar la expresión endógena de los factores de transcripción Sp1, Ets-1, ZNF202 y de los 6 miembros de la familia GATA en la línea celular COS7. El ADNc sintetizado a partir de ARN total de células COS7 se utilizó como molde en una reacción de PCR en la cual se emplearon los oligonucleótidos indicados en la Tabla 9. Como control de carga se amplificó una región de 200 pb del gen de la β -actina (Figura 23).

Los ensayos de RT-PCR revelaron que todos los factores analizados, excepto GATA-4, se expresan en células COS-7, lo que demuestra de manera indirecta una posible implicación de los factores Ets-1 y GATA en la regulación de la expresión del gen *POMGNT1*.

Todos estos datos demuestran la fuerte unión entre el represor ZNF202 y la secuencia mutada del promotor de *POMGNT1* del paciente, mientras que la actividad del promotor silvestre no se ve afectada.

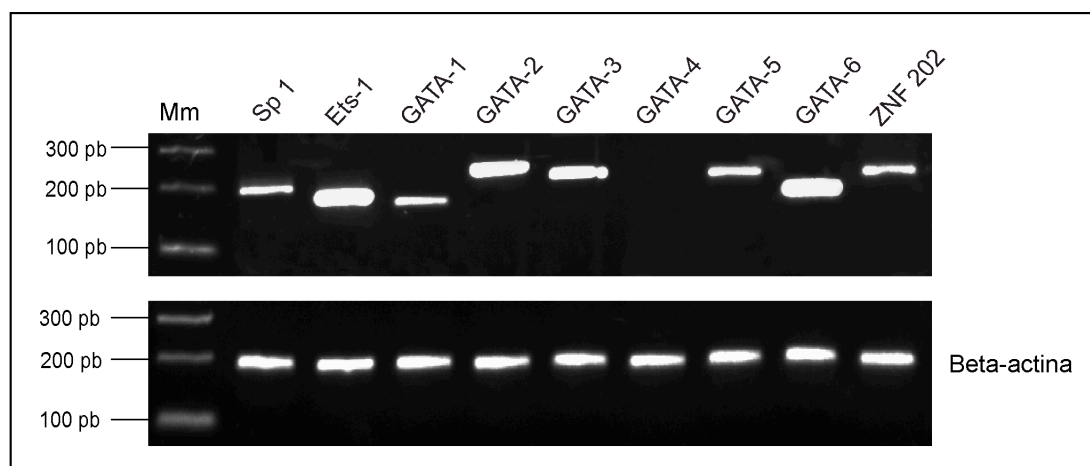


Figura 23. Detección de la expresión endógena de Sp1, de Ets-1, de ZNF202 y de GATA1 hasta GATA 6 en la línea celular COS7 mediante ensayo de RT-PCR. Como control interno se amplificó una región del gen de la β -actina. Mm, marcador de peso molecular de ADN de 100 pb.

2.4.4. Disminución de los niveles de ARNm y proteína de *POMGNT1* en el paciente LGMD20

Para confirmar que la bajada de la actividad transcripcional del promotor mutado se debía a la fuerte unión del represor transcripcional ZNF202 se realizó la cuantificación de la expresión del gen *POMGNT1*. Dado que carecíamos de muestras de ARN o proteína total del paciente LGMD20, se llevó a cabo la clonación de la región codificante completa de *POMGNT1* en el vector pcDNA3-Flag, situándola a continuación del promotor proximal de *POMGNT1* silvestre o mutado (construcciones P_{WT} -*POMGNT1*-pcDNA3 y P_{Mut} -*POMGNT1*-pcDNA3). Como control positivo se utilizó la construcción P_{CMV} -*POMGNT1*-pcDNA3 que mantenía el promotor viral CMV propio del vector. Las tres construcciones, junto con el vector vacío (control negativo), se transfectaron transitoriamente en células COS7 y después de 48 horas se llevó a cabo la extracción de ARN y de proteína total. Los ensayos de qRT-PCR revelaron una bajada de aproximadamente el 50% en la expresión del gen *POMGNT1* en el caso de la construcción que contenía el promotor mutado (Figura 24A). De manera similar, los ensayos de WB evidenciaron una bajada de alrededor del 70% en la expresión de proteína correspondiente a la construcción mutada en comparación con la silvestre (Figura 24B y C). De manera conjunta, estos estudios sugieren que el represor transcripcional ZNF202 inhibe considerablemente la actividad promotora del gen *POMGNT1*, generando un descenso de los niveles de ARNm y proteína.

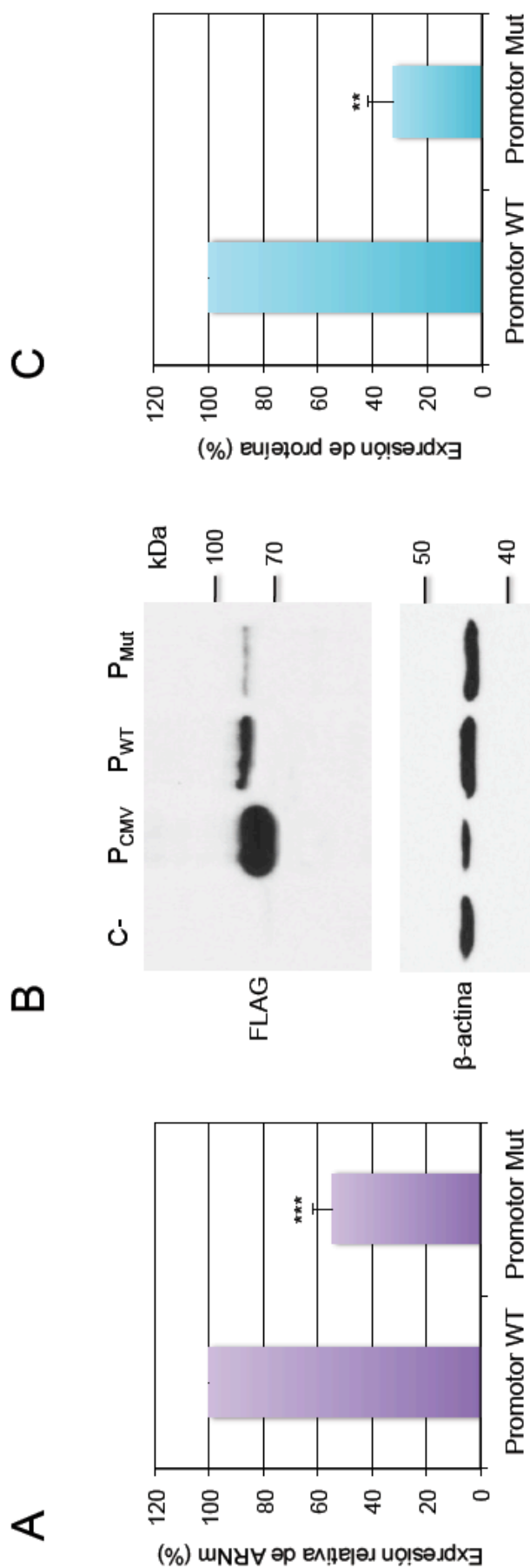


Figura 24. Bajada de la expresión de ARNm y proteína POMGNT1 en el paciente LGMD2O. Las construcciones P_{CMV}-POMGNT1-pcDNA3 (P_{CMV}), P_{WT}-POMGNT1-pcDNA3 (P_{WT}) y P_{Mut}-POMGNT1-pcDNA3 (P_{Mut}), junto con el vector vacío (C-), se transfirieron en células COS7 y se analizaron los niveles de expresión de ARNm y proteína a las 48 horas post-transfección. (A) Ensayo de qRT-PCR evidenciando la bajada de la actividad del promotor de POMGNT1 del paciente LGMD2O (Promotor Mut) en comparación con el promotor silvestre (Promotor WT). Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos frente al control (promotor POMGNT1 silvestre). Los experimentos se realizaron por triplicado y en tres ensayos independientes. Tres asteriscos (***) indican una $p < 0,0001$. (B) La expresión proteica se analizó mediante ensayo de Western blot utilizando el anticuerpo anti-Flag. La expresión de β-actina se utilizó como control de carga. (C) Cuantificación de la expresión de POMGNT1 normalizada frente a la expresión de β-actina. Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos respecto del control (promotor POMGNT1 silvestre). Los experimentos se realizaron por triplicado y en tres ensayos independientes. Dos asteriscos (**) indican una $p < 0,009$.

3. Purificación y caracterización glicoproteómica del α -distroglicano nativo de miotubos de ratón C2C12

Para un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares subyacentes en las enfermedades causadas por fallos en los procesos de glicosilación, se precisa el uso de técnicas que permitan la caracterización de los perfiles de glicosilación de las proteínas a partir de muestras biológicas complejas. Como se ha mencionado previamente, la interacción entre el α -DG y la laminina de la MEC esta mediada por los O-glicanos presentes en la región de tipo mucina del α -DG, y cualquier modificación que altera la síntesis de estos O-glicanos da lugar a un conjunto de patologías denominadas distroglicanopatías, y que presentan defectos estructurales en distintos órganos como músculo, cerebro y ojo. Dado que se desconocen las consecuencias moleculares de los defectos en la glicosilación del α -DG, se necesitan determinar las características estructurales de esta proteína tanto en tejidos procedentes de individuos sanos como de enfermos con distroglicanopatía.

En esta tesis se ha realizado la purificación del α -DG nativo de miotubos de ratón en cultivo y posteriormente la caracterización de los O-glicanos presentes en el dominio de tipo mucina. Se ha elegido una línea celular de mioblastos debido a que el músculo es uno de los principales órganos afectados en los pacientes con distroglicanopatía.

3.1. Análisis de la expresión del distroglicano y de los genes implicados en su glicosilación

Para determinar el nivel de expresión del DG y de los genes: *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN*, *FKRP* y *LARGE* en los mioblastos y los miotubos de ratón C2C12 se llevó a cabo un ensayo de qRT-PCR.

Como se puede ver en la Figura 25, se detectó un aumento en los niveles de expresión de *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN* y *LARGE*, tanto en mioblastos como en miotubos C2C12 comparado con el músculo esquelético de ratón. Sin embargo, las diferencias entre la expresión de *FKRP* en mioblastos y miotubos de ratón en cultivo frente al tejido muscular no fueron apreciables. En las líneas celulares humanas HEK293T y HBL100 no se observaron diferencias significativas entre los niveles de expresión de estos genes comparado con el músculo de ratón. Sólo en el caso del gen

POMT1 se pudo observar una expresión aumentada en estas dos líneas celulares humanas frente al músculo de ratón.

El análisis de la expresión de *DAG1* evidenció un aumento significativo de su expresión en miotubos de ratón en cultivo en comparación con los cultivos de mioblastos o con el tejido muscular de ratón (Figura 26A). Sin embargo, sus niveles de expresión en las células HEK293T y HBL100 se mantenían muy bajos en comparación con el músculo esquelético de ratón.

En vista de estos resultados se decidió la purificación del α -DG a partir de miotubos de ratón.

3.2. Purificación del α -dystroglicano nativo de miotubos de ratón (células C2C12 diferenciadas)

Los mioblastos de ratón de la línea celular C2C12 se crecieron hasta alcanzar una confluencia del 80%, momento en el cual se indujo la diferenciación a miotubos cambiando el suero fetal bovino al 10% por suero de caballo al 2%. Las células se lisaron después de 4 días de diferenciación y la purificación del α -DG, a partir de lisado proteico total, se llevó a cabo mediante enriquecimiento con WGA-agarosa, y posterior inmunoprecipitación con el anticuerpo VIA4-1 acoplado a bolitas magnéticas.

A continuación las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, y el α -DG se identificó mediante WB utilizando el anticuerpo I1H6C4 (Figura 26B).

La banda correspondiente al α -DG, con un peso molecular de entre 100-130 kDa, se recortó de un gel teñido con azul de Coomassie (Figura 26C), que se había sometido a electroforesis en paralelo con el gel de confirmación del α -DG mediante WB. El α -DG se sometió a digestión con tripsina en el propio gel, y los péptidos tripticos se caracterizaron mediante espectrometría de masas en tándem.

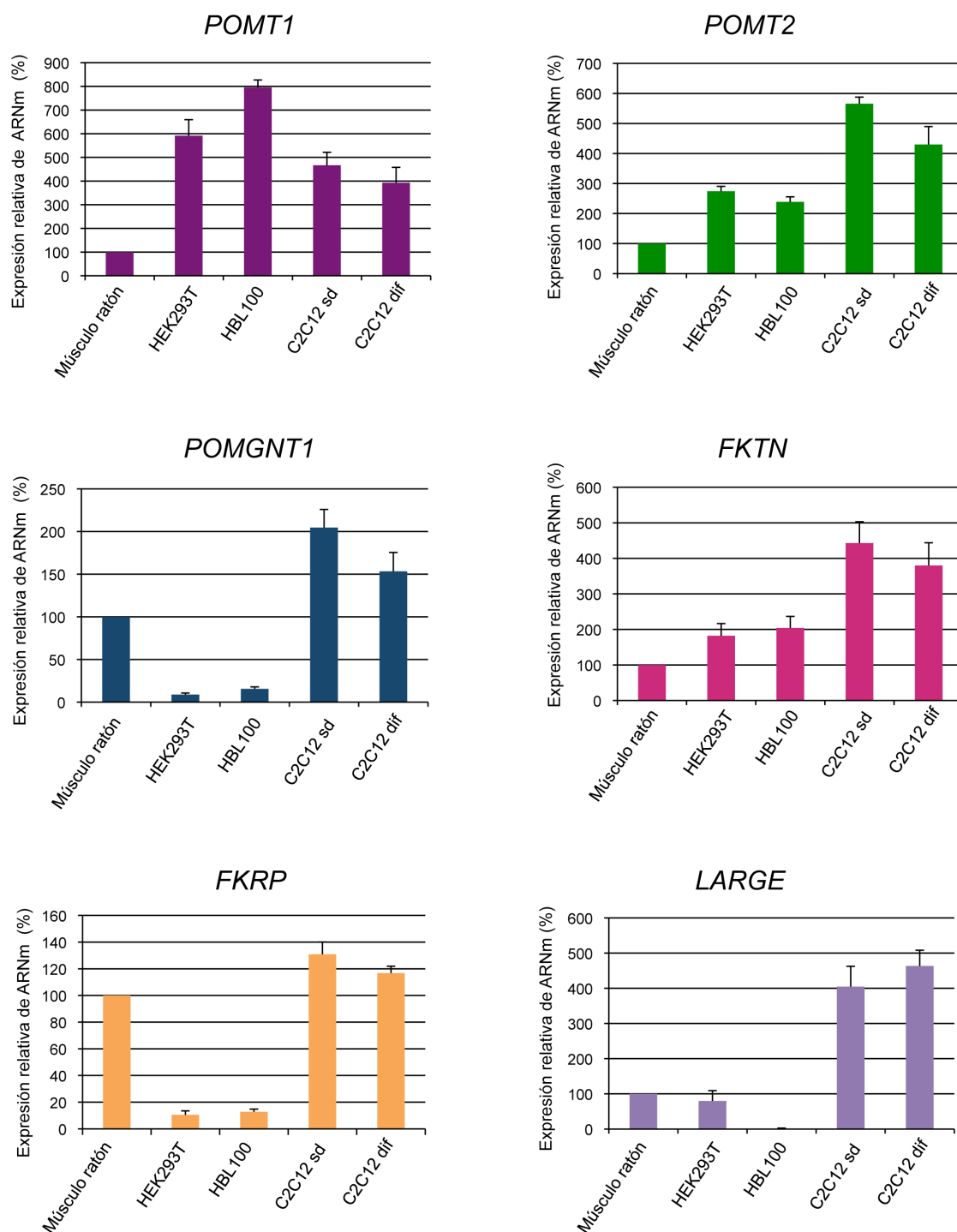


Figura 25. Determinación mediante qRT-PCR de los niveles de expresión de los genes *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN*, *FKRP* y *LARGE* en músculo esquelético de ratón, mioblastos de ratón C2C12 (C2C12 sin diferenciar, sd), miotubos de ratón C2C12 (C2C12 diferenciados, dif) y en las líneas celulares humanas HEK293T y HBL100. Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos frente al control (músculo de ratón), al que se le dio un valor del 100%.

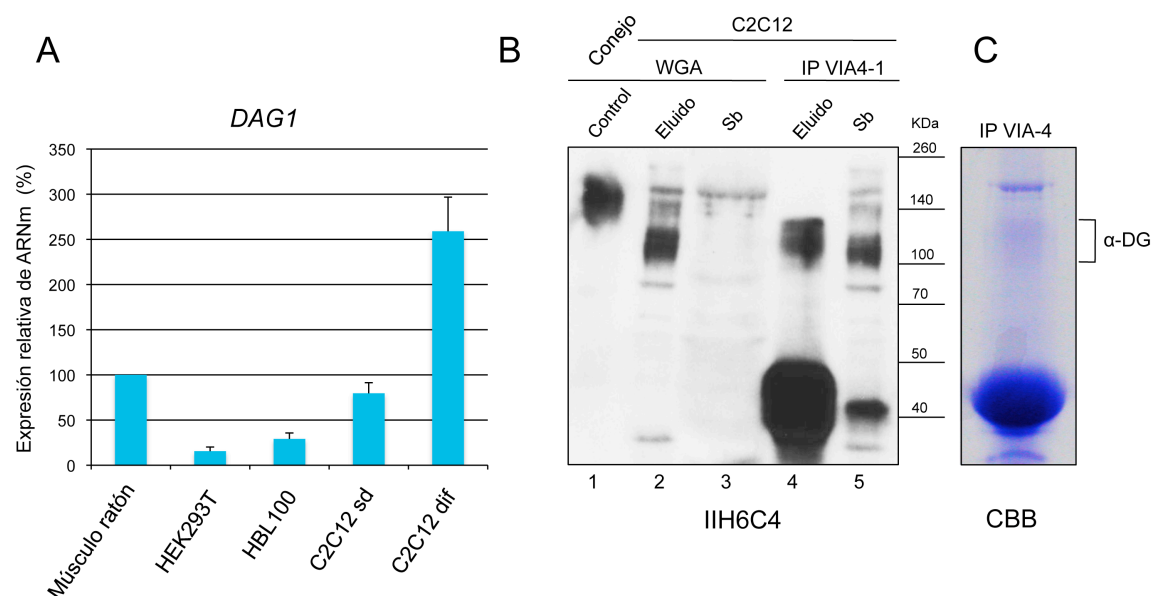


Figura 26. Expresión y purificación del α -DG de miotubos de ratón C2C12. (A) Análisis del nivel de expresión de *DAG1* mediante qRT-PCR en músculo esquelético de ratón, mioblastos de ratón C2C12 (C2C12 sin diferenciar, sd), miotubos de ratón C2C12 (C2C12 diferenciados, dif) y en las líneas celulares humanas HEK293T y HBL100. Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos frente al control (músculo de ratón). (B) Identificación mediante Western blot (con el anticuerpo IIH6C4) del α -DG purificado a partir de mioblastos C2C12. Se muestran las glicoproteínas eluidas tras el enriquecimiento con WGA-agarosa (carril 2), el sobrenadante obtenido tras el enriquecimiento con WGA-agarosa (Sb) (carril 3), el α -DG purificado tras la inmunoprecipitación (IP) con el anticuerpo VIA4-1 (carril 4) y el sobrenadante IP (carril 5). Como control positivo se utilizó un extracto enriquecido de glicoproteínas de músculo de ratón (carril 1). (C) Identificación del α -DG altamente purificado mediante tinción con azul de Coomassie (CBB), donde se puede observar una banda amplia alrededor de 100-130 kDa. También se puede observar una banda inespecífica alrededor de 200 kDa que representa la miosina y otra intensa alrededor de 45 kDa que corresponde al anticuerpo VIA4-1.

3.3. Caracterización glicoproteómica del α -dystroglicano de ratón

El análisis por espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos (LC-MS/MS) reveló una alta abundancia del α -DG dentro de las proteínas existentes en la banda purificada, y se identificaron dos péptidos no-glicosilados de la región N-terminal y nueve péptidos no-glicosilados de la región C-terminal del α -DG (Figura 27).

Sin embargo, los péptidos glicosilados se identificaron a partir de los espectros de fragmentación obtenidos tras el análisis de espectrometría de masas en tándem basada en la disociación inducida por colisión CID-MS/MS (MS^2) y CID-MS/MS/MS (MS^3). Los glicopéptidos se analizaron con la herramienta GlycoMod (Tablas 12, 13, 14, 15 y 16) observándose que los glicopéptidos deducidos correspondían fielmente a los péptidos trípticos del α -DG (con una precisión de la medida de las masas de entre $\pm 0,5$ -5 ppm, Vppm).

Los patrones de fragmentación de las uniones glicosídicas de los espectros MS2 y MS3 se analizaron para determinar la estructura de los glicanos, identificándose si el tipo de estructura “core” se basaba en enlaces HexNAc-*O*-Ser/Thr o Hex-*O*-Ser/Thr.

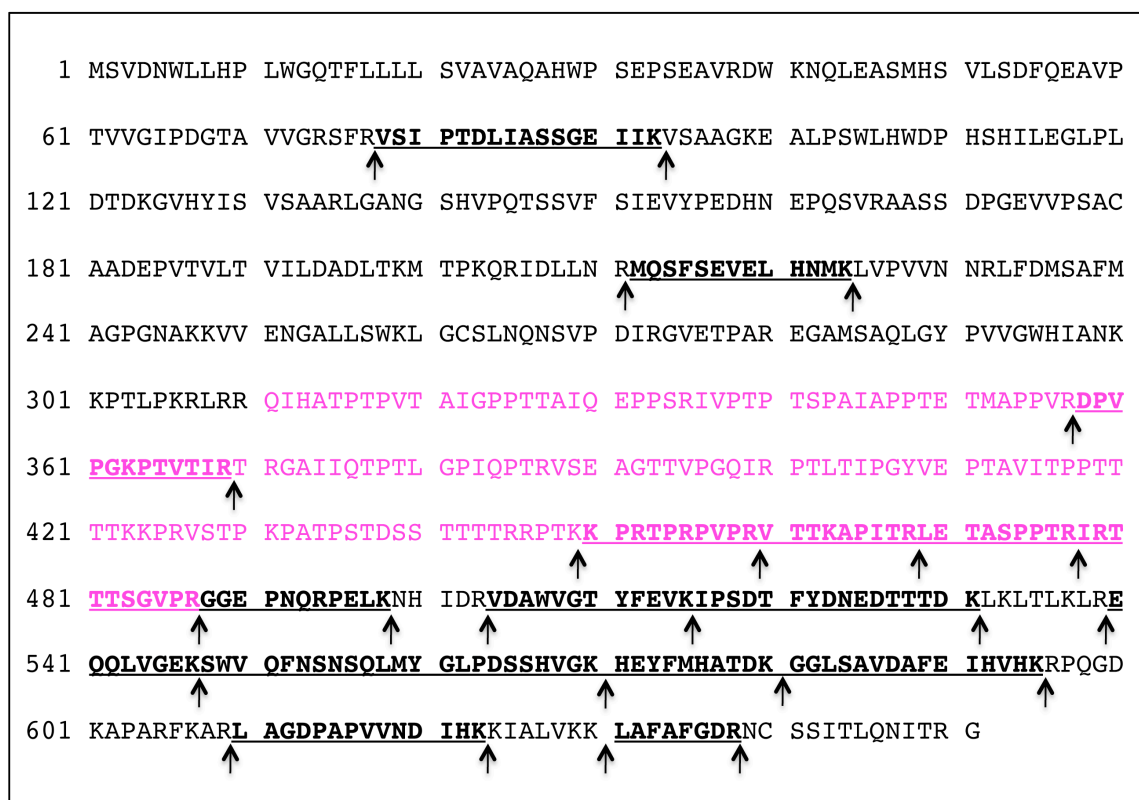


Figura 27. Secuencia proteica del α -DG de ratón y la posición de los péptidos y glicopéptidos identificados en el α -DG purificado de miotubos C2C12. El dominio de tipo mucina se encuentra marcado en color rosa. Los dos péptidos dentro del dominio N-terminal (aa 1-310) y los nueve péptidos dentro del dominio C-terminal (aa 488-651) se encuentran subrayados y en negrita. Los cinco glicopéptidos dentro del dominio de tipo mucina se encuentran subrayados, en negrita y en color rosa. Las flechas indican los sitios de corte proteolítico de la tripsina.

3.3.1. Baja heterogeneidad de las estructuras “core” de los *O*-glicanos de tipo Hex-*O*-Ser/Thr

Se identificaron 67 glicopéptidos que correspondían a 5 péptidos trípticos del dominio de tipo mucina del α -DG (Figura 27).

Para el glicopéptido p358-369 (DPVPGKPTVTIR) se han identificado sólo uniones **Hex-*O*-Ser/Thr**, lo que sugiere que la O-manosilación ha ocurrido sobre los dos sitios potenciales de O-glicosilación Thr365 y Thr367 presentes en esta secuencia (Figuras 28 y 30). Además, la unión **Hex-*O*** se encontraba mayoritariamente elongada con el disacárido Hex-HexNAc, sugiriendo que el glicano identificado presentaba una estructura “core” LacNAc-Man-*O*-Ser/Thr (Gal β 4GlcNAc β 2Man α 1-*O*-Ser/Thr). Las

estructuras “core” Lac-Man presentaban heterogeneidad con respecto a las modificaciones adicionales terminales, ya que el residuo final de la cadena podía ser NeuAc (ácido N-acetil-neuramínico) (**NeuAc**-Hex-HexNAc-**Hex-O**-Thr) o NeuGc (ácido N-glicolil neuramínico) (**NeuGc**-Hex-HexNAc-**Hex-O**-Thr). De todas formas, la abundancia relativa del residuo NeuGc era sólo del 4% comparado con el residuo NeuAc.

El residuo NeuGc es un derivado del ácido neuramínico y se encuentra presente en glicoproteínas no humanas, ya que los humanos no tienen la capacidad de sintetizar este tipo de azúcar.

También se identificó una estructura consistente en Hex-Hex-HexNAc-**Hex-O**-Ser/Thr, y que corresponde probablemente al antígeno Galili ($\text{Gal}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$) (Figura 28 y 30).

Además, entre los O-glicanos presentes sobre el péptido p358-369 se han detectado estructuras que contienen en su composición residuos de fucosa, similares a los antígenos de los grupos sanguíneos B ($\text{Gal}\alpha 3[\text{Fuc}\alpha 2]\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$) y H ($\text{Fuc}\alpha 2\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}$) (Figura 30). Los espectros de fragmentación CID-MS2 de los glicopéptidos correspondientes al péptido p358-369 se indican en las Figuras 29 y 31, y también en el Anexo I (Figura 1, 2, 3 y 4).

3.3.2. Alta heterogeneidad de las estructuras “core” de los O-glicanos de tipo HexNAc-O-Ser/Thr

Los cuatro glicopéptidos p450-459, p460-468, p469-477 y p478-487, adyacentes uno al otro en la secuencia proteica, presentaban una alta heterogeneidad de las estructuras “core” de los O-glicanos. De los cuatro glicopéptidos analizados, los únicos que presentaban enlaces glicosídicos de tipo **Hex-O**-Ser/Thr eran los péptidos p464-468 (APITR) (Figura 34) y p469-477 (LETASPPTR) (Figura 36). De todas formas, la abundancia de las uniones **Hex-O**-Ser/Thr en estos dos péptidos era ínfima comparada con la de las uniones **HexNAc-O**-Ser/Thr.

El principal enlace O-glicosídico presente sobre estos cuatro glicopéptidos era de tipo **HexNAc-O**-Ser/Thr. Este tipo de enlace se encontraba elongado con residuos de Hex o HexNAc (Figuras 32, 34, 36 y 38). Muchos de los glicanos de tipo Hex-**HexNAc-O**-Ser/Thr presentan frecuentemente un residuo de ácido siálico unido a la hexosa terminal. También se encontraron glicanos Hex-**HexNAc-O**-Ser/Thr

disialilados que presentaban un residuo de ácido siálico unido a la hexosa terminal y el otro a la HexNAc interna (Figura 32, 34, 36, 38).

Para el péptido p450-459 (KPRTPRPVPR), que tiene un único sitio potencial de O-glicosilación (Thr453), se han encontrado dos glicanos “core” tipo 2 HexNAc(Hex) **HexNAc-O-Ser/Thr**, uno de ellos en combinación con una estructura típica del epítipo Galili, y también un glicano Hex-**HexNAc-O-Ser/Thr** disialilado (Figura 32). Los espectros de fragmentación CID-MS2 de los glicopéptidos correspondientes al péptido p450-459 (KPRTPRPVPR) se indican en la Figura 33.

El péptido p460-468 (VTTKAPITR) se ha encontrado sustituido con dos y tres O-glicanos de tipo HexNAc-**HexNAc-O-Ser/Thr**, pero la abundancia relativa del péptido doble glicosilado era sólo del 10% frente al péptido triple glicosilado (Figura 34). Sobre este péptido se ha identificado también una estructura “core” tipo 2 HexNAc(Hex)**HexNAc-O-Ser/Thr**. Los espectros de fragmentación CID-MS2 de los glicopéptidos correspondientes al péptido p460-468 (VTTKAPITR) se indican en la Figura 35 y en el Anexo I (Figura 5, 6, 7 y 8).

Para el péptido p469-477 (LETASPPTR), además de las estructuras Hex-**HexNAc-O-Ser/Thr** mono y disialiladas y las estructuras de tipo HexNAc-**HexNAc-O-Ser/Thr**, se han encontrado también glicanos Hex-**HexNAc-O-Ser/Thr** que presentaban un residuo NeuGc unido a la hexosa terminal (Figura 36). Los espectros de fragmentación CID-MS2 de los glicopéptidos correspondientes al péptido p469-477 (LETASPPTR) se indican en la Figura 37 y en el Anexo I (Figura 9 y 10).

Finalmente, el péptido p478-487 (IRTTTSGVPR) se ha encontrado modificado mediante la adición de tres y cuatro glicanos de tipo NeuAc-Hex-**HexNAc-O-Ser/Thr**, y también de glicanos HexNAc-**HexNAc-O-Ser/Thr** (Figura 38). Los espectros de fragmentación CID-MS2 de los glicopéptidos correspondientes al péptido p478-487 (IRTTTSGVPR) se indican en la Figura 39 y en el Anexo I (Figura 11, 12 y 13).

Tabla 12. Resumen de los péptidos y glicopéptidos p358-369 (DPVPGKPTVTIR) identificados para el α -DG de miotubos de ratón C2C12.

Relación m/z del precursor	∇ masa (ppm)	Composición del glicano	Posición	Secuencia peptídica
754,0282	0,071	(Hex) ₃ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
972,7688	-2	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₂	358-369	DPVPGKPTVTIR
656,9954	-1,6	(Hex) ₃ (HexNAc) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
875,7371	-1,9	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
929,7561	-0,4	(Hex) ₅ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
778,7037	-4,4	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂	358-369	DPVPGKPTVTIR
832,7274	-2,9	(Hex) ₅ (HexNAc) ₂	358-369	DPVPGKPTVTIR
930,0958	-1,09	(Hex) ₅ (HexNAc) ₂ (DeoxyHex) ₂	358-369	DPVPGKPTVTIR
924,4288	4,3	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂ (DeoxyHex) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
930,0973	0,5	(Hex) ₅ (HexNAc) ₂ (DeoxyHex) ₂	358-369	DPVPGKPTVTIR
935,4301	1,7	(Hex) ₆ (HexNAc) ₂ (DeoxyHex) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
886,7435	1,1	(Hex) ₆ (HexNAc) ₂	358-369	DPVPGKPTVTIR
881,413	2,4	(Hex) ₅ (HexNAc) ₂ (DeoxyHex) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
832,7271	2,7	(Hex) ₅ (HexNAc) ₂	358-369	DPVPGKPTVTIR
876,0812	2,3	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂ (DeoxyHex) ₂	358-369	DPVPGKPTVTIR
881,4096	-1,3	(Hex) ₅ (HexNAc) ₂ (DeoxyHex) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
778,7096	3,1	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂	358-369	DPVPGKPTVTIR
827,3931	0	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂ (DeoxyHex) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
724,689	-0,6	(Hex) ₃ (HexNAc) ₂	358-369	DPVPGKPTVTIR
978,45	7,6	(Hex) ₅ (HexNAc) ₂ (DeoxyHex) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
929,764	8	(Hex) ₅ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
881,0671	-3,8	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂ (NeuGc) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
875,7328	-6,8	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
924,4222	-2,8	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂ (DeoxyHex) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
711,0162	2,8	(Hex) ₄ (HexNAc) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
778,707	-0,1	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂	358-369	DPVPGKPTVTIR
705,6884	8,4	(Hex) ₃ (HexNAc) ₁ (DeoxyHex) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
656,9944	-3,1	(Hex) ₃ (HexNAc) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
602,9783	-0,8	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
651,6633	-2,3	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (DeoxyHex) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
972,7662	-4,7	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₂	358-369	DPVPGKPTVTIR
729,8237	-8,5	(Hex) ₄ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₂	358-369	DPVPGKPTVTIR
754,037	11,7	(Hex) ₃ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
705,3454	4,6	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuGc) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
700,0112	1	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₁	358-369	DPVPGKPTVTIR
607,3067	1,2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁	364-369	PTVTIR

Tabla 13. Resumen de los péptidos y glicopéptidos p450-459 (KPRTPRPVPR) identificados para el α -DG de miotubos de ratón C2C12.

Relación m/z del precursor	∇ masa (ppm)	Composición del glicano	Posición	Secuencia peptídica
538,5222	0,2	(Hex) ₁ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₂	450-459	KPRTPRPVPR
615,2901	0,6	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₁	453-459	TPRPVPR
669,3095	1,7	(Hex) ₃ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₁	453-459	TPRPVPR
590,6117	1,7	(Hex) ₃ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₂	453-459	TPRPVPR

Tabla 14. Resumen de los péptidos y glicopéptidos p460-468 (VTTKAPITR) identificados para el α -DG de miotubos de ratón C2C12.

Relación m/z del precursor	∇ masa (ppm)	Composición del glicano	Posición	Secuencia peptídica
600,3126	3,2	(HexNAc) ₄	460-468	VTTKAPITR
735,6969	0,3	(HexNAc) ₆	460-468	VTTKAPITR
985,7686	3	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (NeuAc) ₃	460-468	VTTKAPITR
600,3137	5,1	(HexNAc) ₄	460-468	VTTKAPITR
798,4266	5,3	(HexNAc) ₃	460-468	VTTKAPITR
789,7191	6	(Hex) ₁ (HexNAc) ₆	460-468	VTTKAPITR
722,0258	6,2	(Hex) ₁ (HexNAc) ₅	460-468	VTTKAPITR
735,6989	3	(HexNAc) ₆	460-468	VTTKAPITR
1103,0469	5	(HexNAc) ₆	460-468	VTTKAPITR
1001,5048	2,9	(HexNAc) ₅	460-468	VTTKAPITR
780,7028	5,3	(Hex) ₁ (HexNAc) ₃ (NeuAc) ₂	460-468	VTTKAPITR
916,0816	-3,6	(Hex) ₁ (HexNAc) ₅ (NeuAc) ₂	460-468	VTTKAPITR
482,2516	-3,8	(HexNAc) ₂	464-468	APITR
688,3155	2,2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₁	464-468	APITR
902,4153	-5,7	(Hex) ₂ (HexNAc) ₄ (NeuAc) ₂	460-468	VTTKAPITR
819,0544	1,7	(Hex) ₁ (HexNAc) ₅ (NeuAc) ₁	460-468	VTTKAPITR
864,0604	6,2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₃	460-468	VTTKAPITR
985,7679	2,3	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (NeuAc) ₃	460-468	VTTKAPITR
821,0394	-1,5	(Hex) ₃ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₂	460-468	VTTKAPITR
767,0234	0,5	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₂	460-468	VTTKAPITR
888,7357	4,3	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (NeuAc) ₂	460-468	VTTKAPITR

Tabla 15. Resumen de los péptidos y glicopéptidos p469-477 (LETASPPTR) identificados para el α -DG de miotubos de ratón C2C12.

Relación m/z de precursor	∇ masa (ppm)	Composición del glicano	Posición	Secuencia peptídica
678,6381	-0,9	(Hex) ₁ (HexNAc) ₃ (NeuAc) ₁	469-477	LETASPPTR
871,9133	7,2	(Hex) ₁ (HexNAc) ₃	469-477	LETASPPTR
859,0263	-0,9	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₃	469-477	LETASPPTR
790,8766	-4,8	(HexNAc) ₃	469-477	LETASPPTR
683,9681	-3,3	(Hex) ₁ (HexNAc) ₃ (NeuGc) ₁	469-477	LETASPPTR
678,6381	-0,9	(Hex) ₁ (HexNAc) ₃ (NeuAc) ₁	469-477	LETASPPTR
664,9639	0,7	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₁	469-477	LETASPPTR
694,303	1,2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₂	469-477	LETASPPTR
915,9169	2,1	(Hex) ₁ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₁	469-477	LETASPPTR
761,9968	2,2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₂ (NeuAc) ₂	469-477	LETASPPTR
895,4076	6,8	(Hex) ₂ (HexNAc) ₁ (NeuAc) ₁	469-477	LETASPPTR

Tabla 16. Resumen de los péptidos y glicopéptidos p478-487 (IRTTTSGVPR) identificados para el α -DG de miotubos de ratón C2C12.

Relación m/z del precursor	∇ masa (ppm)	Composición del glicano	Posición	Secuencia peptídica
1044,1242	5,2	(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ (NeuAc) ₂	478-487	IRTTTSGVPR
856,1213	7,7	(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ (NeuAc) ₃	478-487	IRTTTSGVPR
928,8907	2,4	(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ (NeuAc) ₄	478-487	IRTTTSGVPR
769,3726	2,3	(HexNAc) ₆	478-487	IRTTTSGVPR
852,7287	1,8	(Hex) ₁ (HexNAc) ₅ (NeuAc) ₁	478-487	IRTTTSGVPR
1019,4388	-0,9	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (NeuAc) ₃	478-487	IRTTTSGVPR
960,7744	12,4	(Hex) ₃ (HexNAc) ₅ (NeuAc) ₁	478-487	IRTTTSGVPR
742,019	-1,09	(Hex) ₂ (HexNAc) ₄	478-487	IRTTTSGVPR
1141,1632	11,1	(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ (NeuAc) ₃	478-487	IRTTTSGVPR
856,1177	3,5	(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ (NeuAc) ₃	478-487	IRTTTSGVPR
755,6949	-0,7	(Hex) ₁ (HexNAc) ₅	478-487	IRTTTSGVPR
928,8944	6,4	(Hex) ₄ (HexNAc) ₄ (NeuAc) ₄	478-487	IRTTTSGVPR
825,3812	6,1	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (NeuAc) ₁	478-487	IRTTTSGVPR
839,0583	7,7	(Hex) ₂ (HexNAc) ₄ (NeuAc) ₁	478-487	IRTTTSGVPR
769,3725	2,1	(HexNAc) ₆	478-487	IRTTTSGVPR
839,0562	5,2	(Hex) ₂ (HexNAc) ₄ (NeuAc) ₁	478-487	IRTTTSGVPR
852,7274	-5,5	(Hex) ₁ (HexNAc) ₅ (NeuAc) ₁	478-487	IRTTTSGVPR
922,4148	7,5	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (NeuAc) ₂	478-487	IRTTTSGVPR
936,0801	-3,6	(Hex) ₂ (HexNAc) ₄ (NeuAc) ₂	478-487	IRTTTSGVPR
764,8345	3,6	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (NeuAc) ₃	478-487	IRTTTSGVPR
1019,433	3,4	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (NeuAc) ₃	478-487	IRTTTSGVPR
837,6068	1,6	(Hex) ₃ (HexNAc) ₃ (NeuAc) ₄	478-487	IRTTTSGVPR

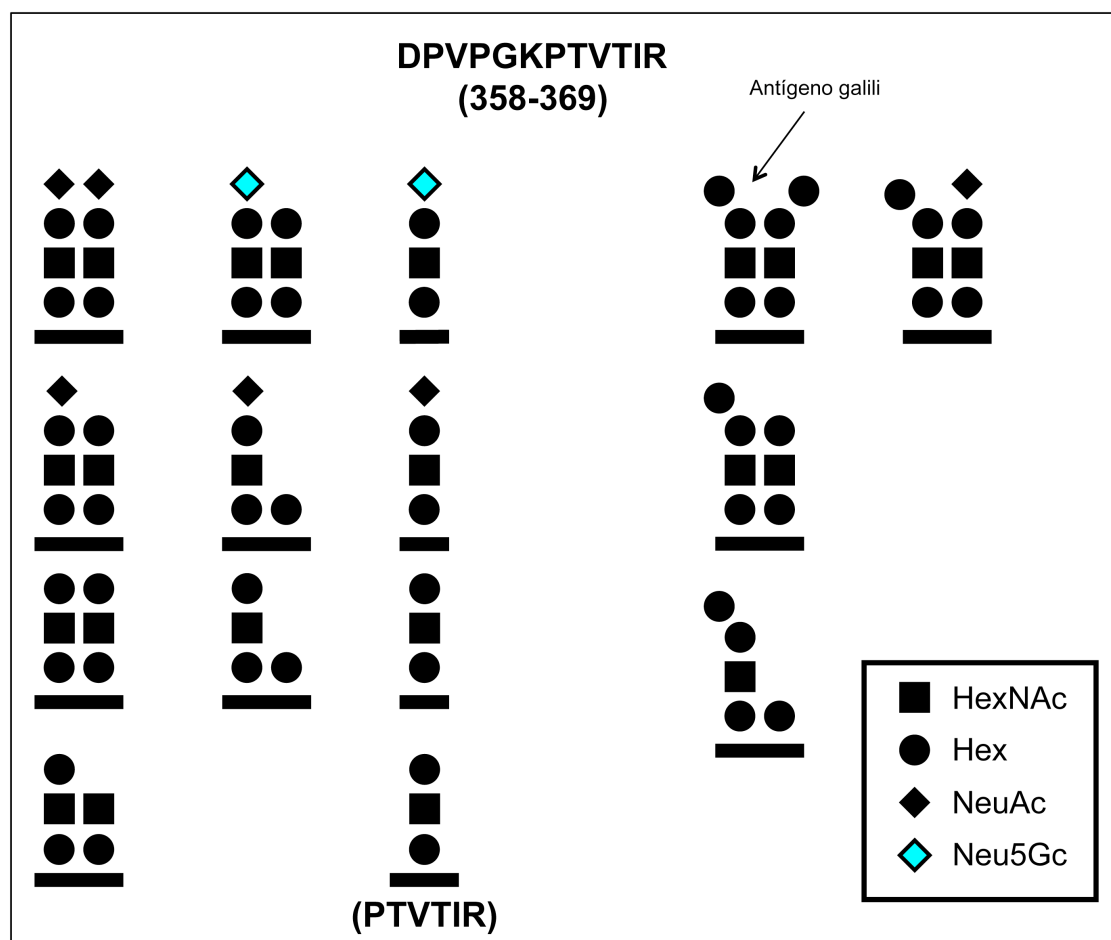


Figura 28. Representación esquemática de los O-glicanos presentes sobre el glicopéptido p358-369 (DPVPGKPTVTIR). Se identificó una modificación de tipo Hex-*O*-Thr, concretamente dos estructuras Hex-HexNAc-Hex-*O*-Thr que presentan residuos de ácido siálico (NeuAc) como residuos terminales. El residuo terminal NeuAc se encontraba presente sobre cada una de las dos estructuras Hex-HexNAc-Hex-*O*-Thr o sobre una de ellas, lo que indica la presencia de dos O-manosilglicanos sobre este péptido. También se han identificado estructuras de tipo Hex-HexNAc-Hex-*O*-Thr que presentan residuos terminales de tipo NeuGc (ácido N-glicolil neuramínico). HexNAc representa las N-acetilhexosaminas de tipo N-acetilglucosamina (GlcNAc) o N-acetilgalactosamina (GalNAc) con una masa nominal de 203 Da. Hex representa las hexosas de tipo galactosa (Gal), glucosa (Glc) o manosa (Man) con una masa nominal de 162 Da. NeuAc representa el ácido N-acetil neuramínico con una masa nominal de 291 Da. Neu5Gc representa el ácido N-glicolil neuramínico con una masa nominal de 307 Da.

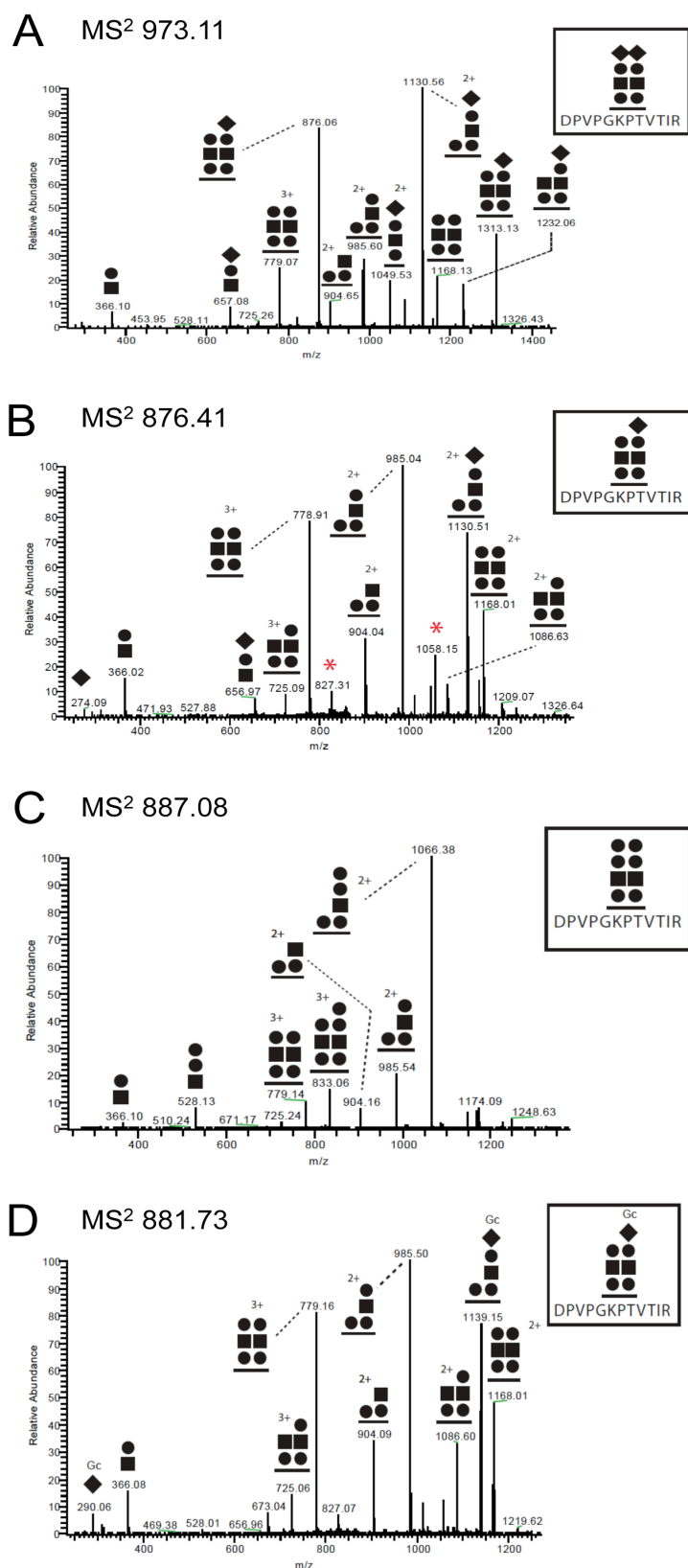


Figura 29. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” Hex-O-Thr presentes sobre el glicopéptido p358-369 (DPVPGKPTVTIR). Los O-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.

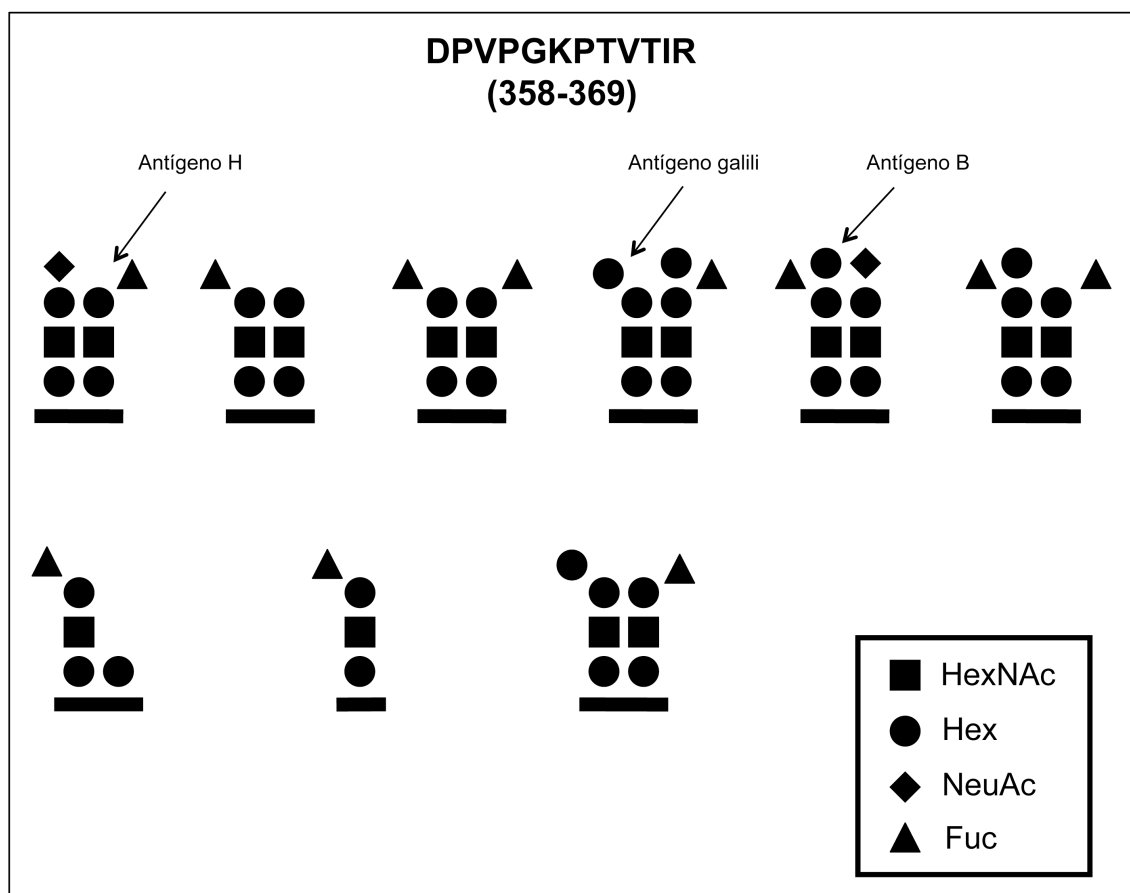


Figura 30. Representación esquemática de los O-glicanos presentes sobre el glicopéptido p358-369 (DPVPGKPTVTIR). Se han identificado estructuras Hex-HexNAc-Hex-*O*-Thr que presentan ácido siálico (NeuAc) o fucosa (Fuc) como residuos terminales. También se pueden observar estructuras similares a los antígenos Galili, o los antígenos de los grupos sanguíneos (B y H). HexNAc representa las N-acetilhexosaminas de tipo N-acetilglucosamina (GlcNAc) o N-acetilgalactosamina (GalNAc) con una masa nominal de 203 Da. Hex representa las hexosas de tipo galactosa (Gal), glucosa (Glc) o manosa (Man) con una masa nominal de 162 Da. NeuAc representa el ácido N-acetil neuramínico con una masa nominal de 291 Da. Fuc representa fucosa con una masa nominal de 146 Da.

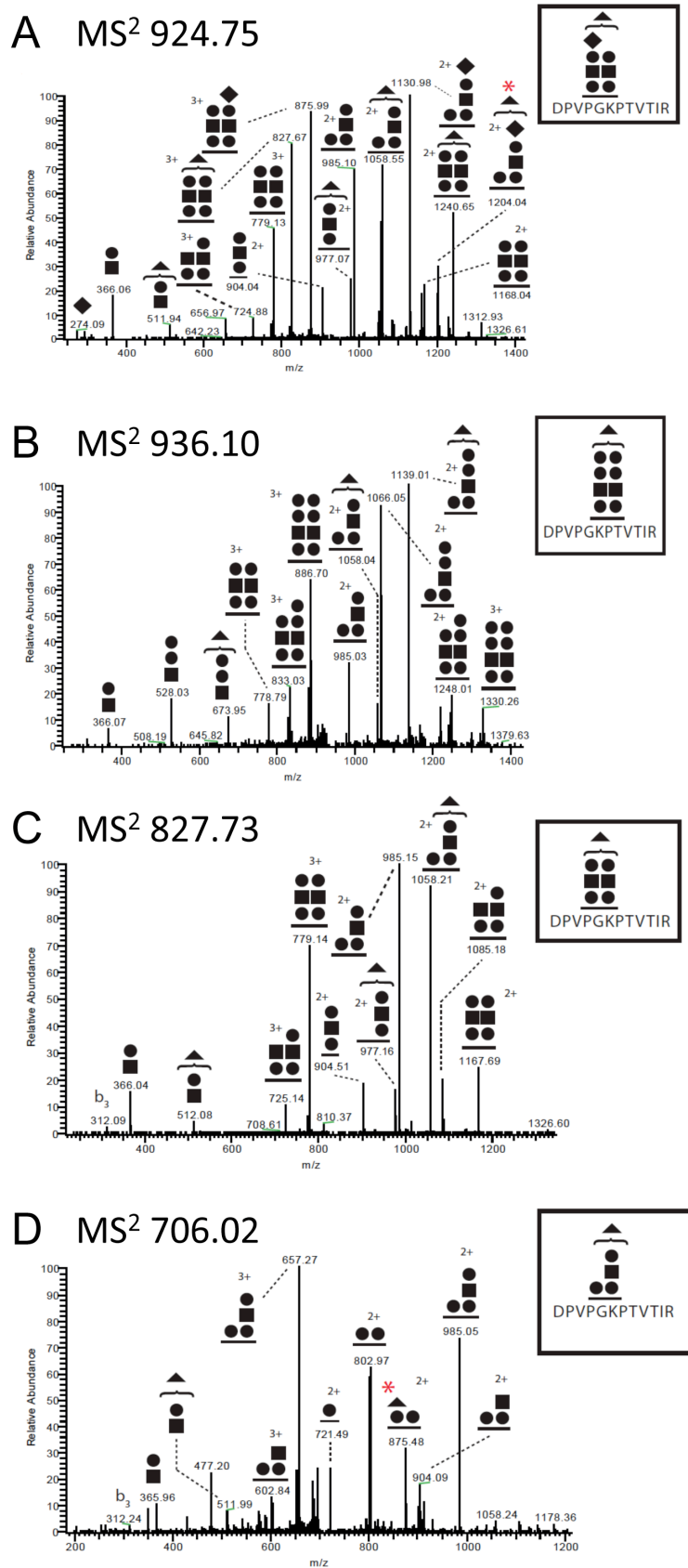


Figura 31. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” Hex-*O*-Thr presentes sobre el glicopéptido p358-369 (DPVPGKPTVTIR). Los O-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.

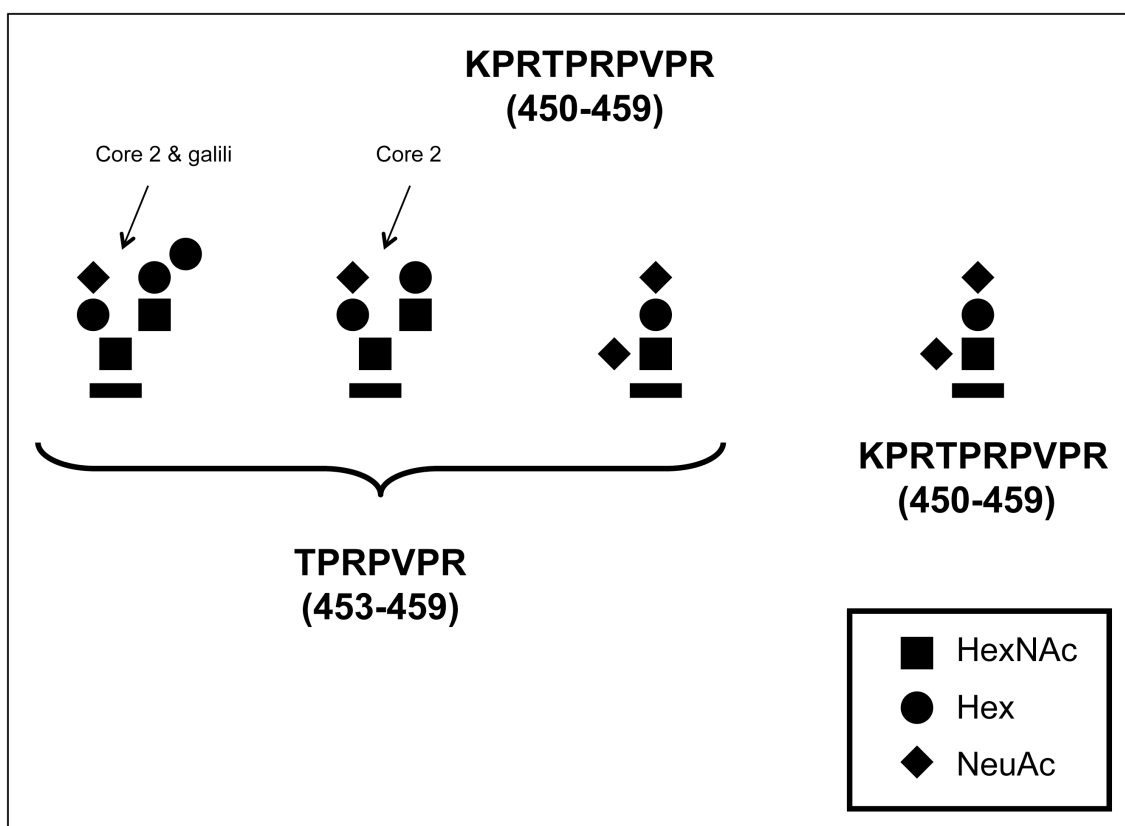


Figura 32. Representación esquemática de los O-glicanos presentes sobre el glicopéptido p450-459 (KPRTPRPVPR). Presenta modificaciones de tipo HexNAc-*O*-Thr, concretamente glicanos “core” tipo 2 HexNAc(Hex)HexNAc-*O*-Thr, uno de ellos en combinación con una estructura típica del epítipo Galili, y también glicanos Hex-HexNAc-*O*-Thr disialilados, que presentan un residuo de ácido siálico unido a la hexosa terminal y otro a la N-acetilhexosamina interna. HexNAc representa las N-acetilhexosaminas de tipo N-acetilglucosamina (GlcNAc) o N-acetilgalactosamina (GalNAc) con una masa nominal de 203 Da. Hex representa las hexosas de tipo galactosa (Gal), glucosa (Glc) o manosa (Man) con una masa nominal de 162 Da. NeuAc representa el ácido N-acetil neuramínico con una masa nominal de 291 Da.

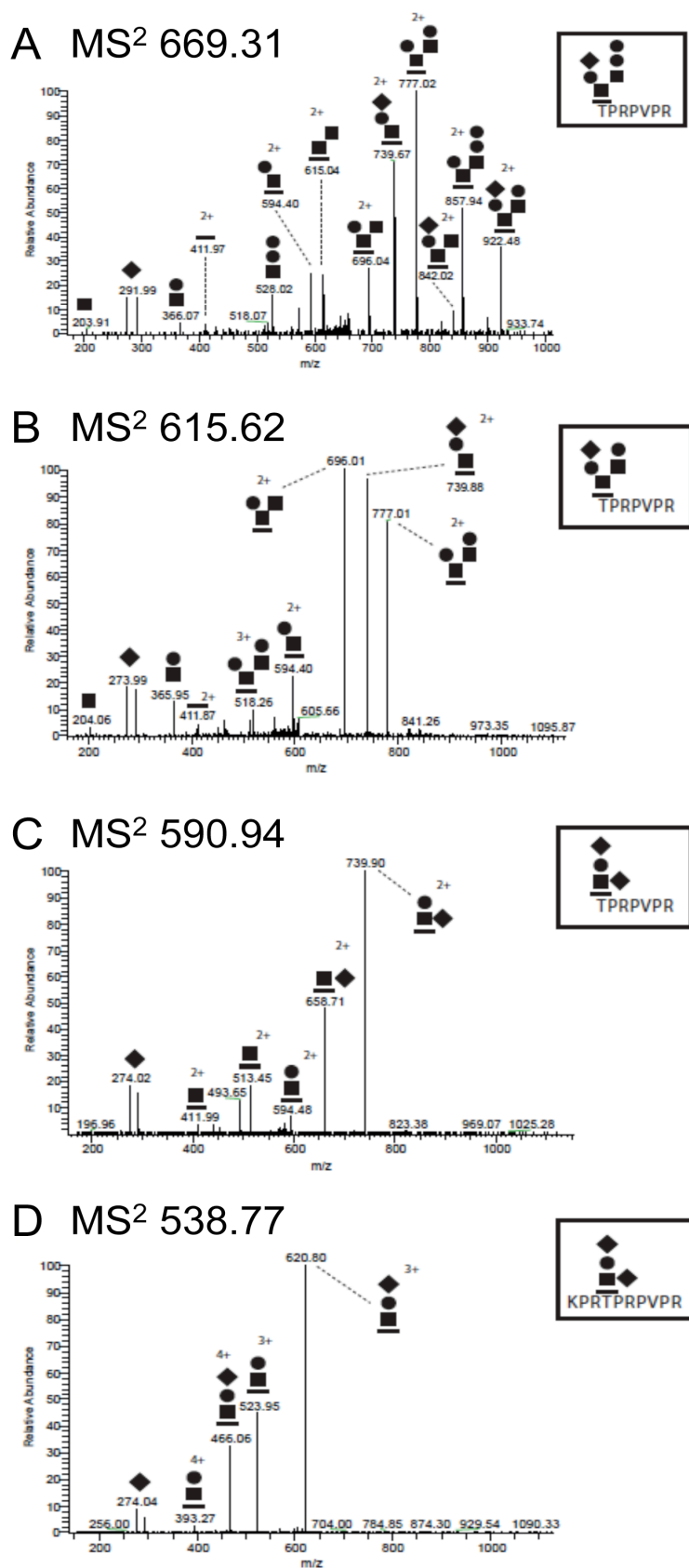


Figura 33. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” HexNAc-*O*-Thr presentes sobre el glicopéptido p450-459 (KPRTPRPVPR). Los O-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.

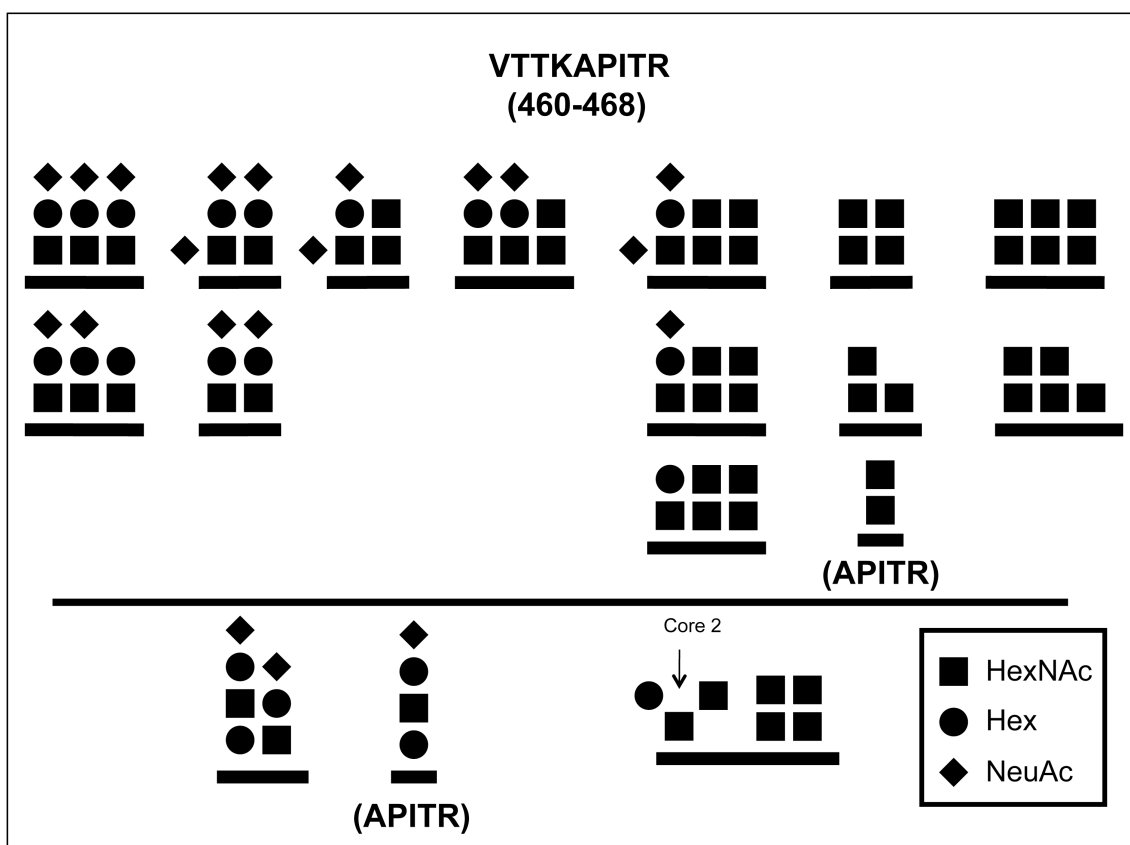


Figura 34. Representación esquemática de los O-glicanos presentes sobre el glicopéptido p460-468 (VTTKAPITR). Presenta modificaciones de tipo HexNAc-*O*-Thr, concretamente estructuras Hex-HexNAc-*O*-Thr que presentan ácido siálico unido a la hexosa terminal, o estructuras Hex-HexNAc-*O*-Thr disialiladas, que presentan un residuo de ácido siálico unido a la hexosa terminal y otro a la N-acetilhexosamina interna. También presenta glicanos “core” tipo 2 HexNAc(Hex)HexNAc-*O*-Thr y estructuras de tipo HexNAc-HexNAc-*O*-Thr. HexNAc representa las N-acetilhexosaminas de tipo N-acetilglucosamina (GlcNAc) o N-acetilgalactosamina (GalNAc) con una masa nominal de 203 Da. Hex representa las hexosas de tipo galactosa (Gal), glucosa (Glc) o manosa (Man) con una masa nominal de 162 Da. NeuAc representa el ácido N-acetil neuramínico con una masa nominal de 291 Da.

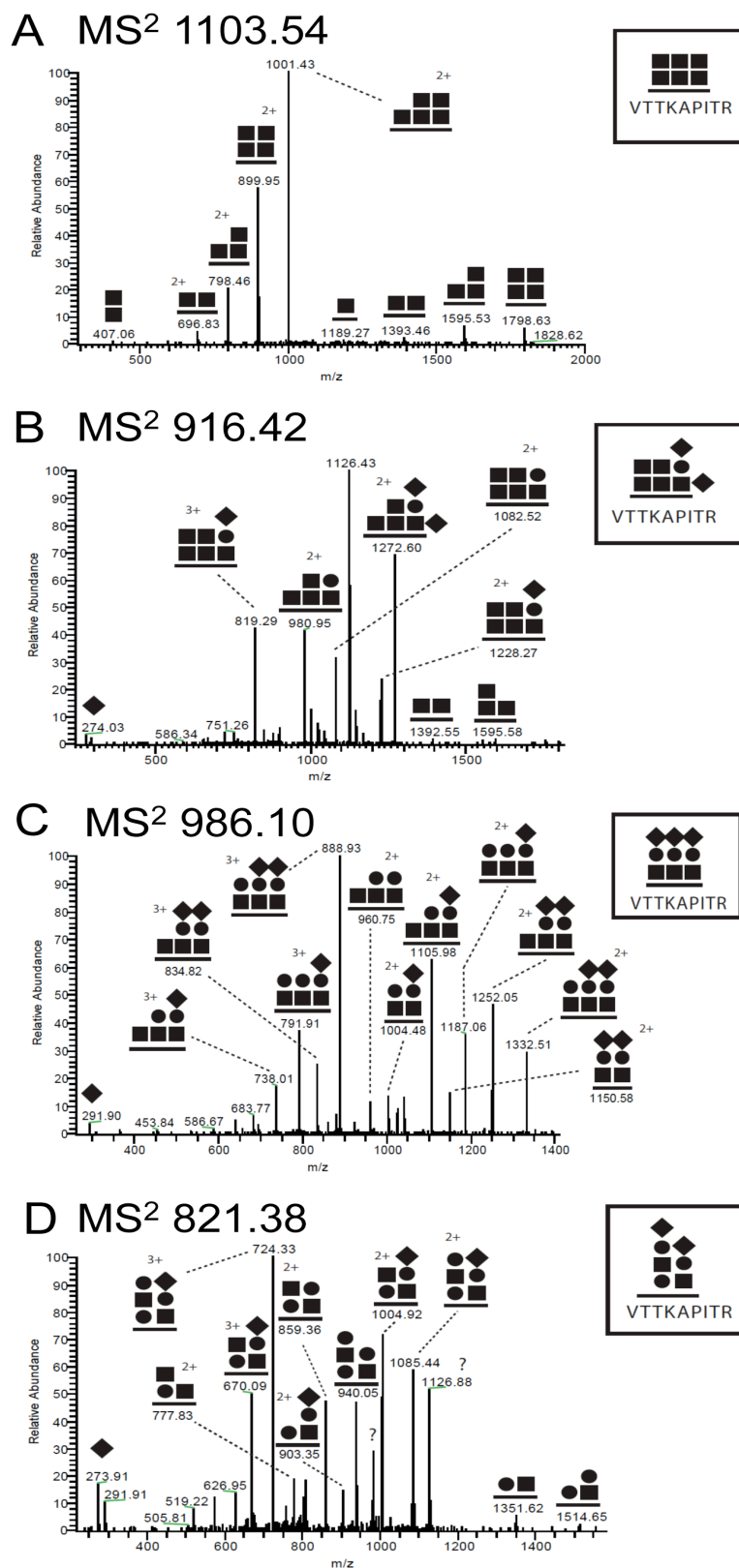


Figura 35. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” HexNAc-*O*-Thr presentes sobre el glicopéptido p460-468 (VTTKAPITR). Los O-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.

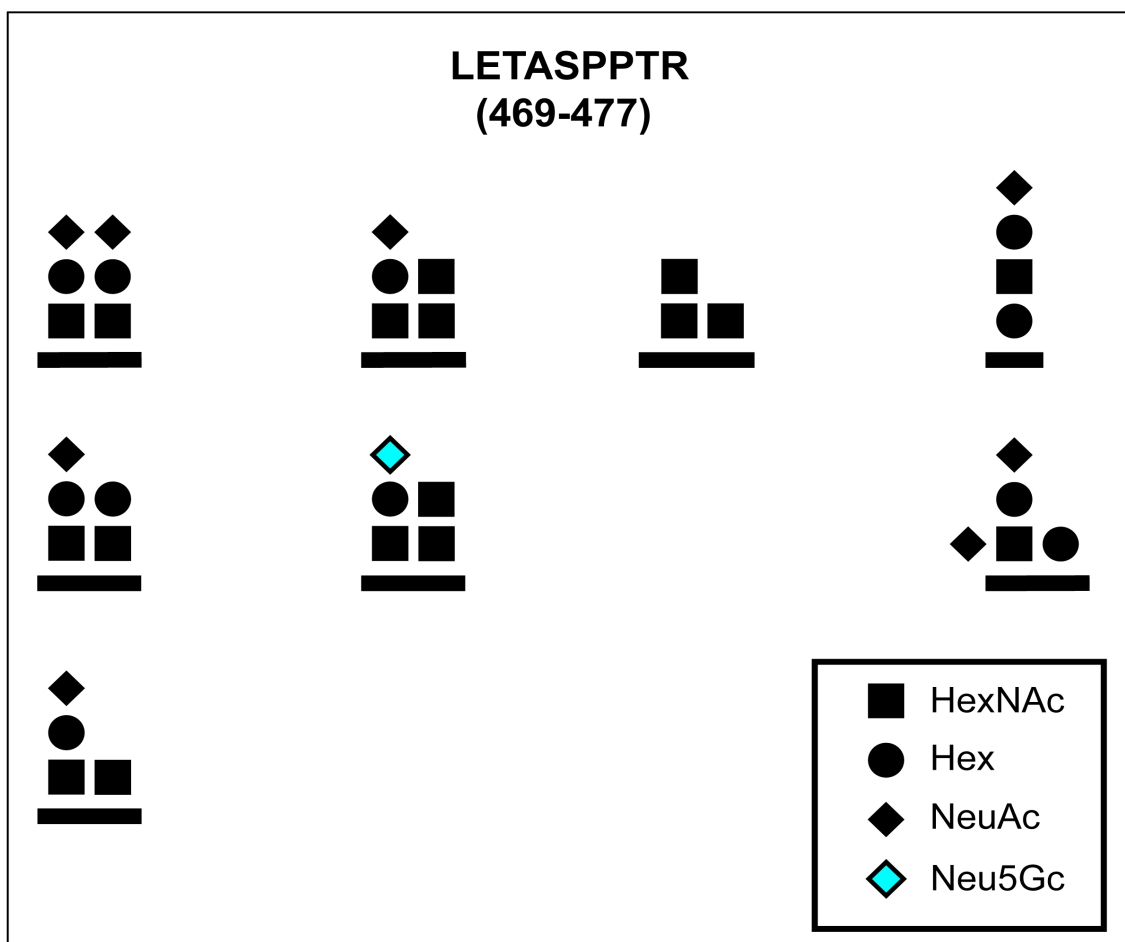


Figura 36. Representación esquemática de los O-glicanos presentes sobre el glicopéptido p469-477 (LETASPPTR). Presenta modificaciones de tipo HexNAc-*O*-Ser/Thr, concretamente estructuras Hex-HexNAc-*O*-Ser/Thr que presentan ácido siálico (NeuAc) o ácido N-glicolil neuramínico (NeuGc) unido a la hexosa terminal, y estructuras Hex-HexNAc-*O*-Ser/Thr disialiladas, que presentan un residuo de ácido siálico unido a la hexosa terminal y otro a la N-acetilhexosamina interna. También presenta estructuras de tipo HexNAc-HexNAc-*O*-Ser/Thr. HexNAc representa las N-acetilhexosaminas de tipo N-acetilglucosamina (GlcNAc) o N-acetilgalactosamina (GalNAc) con una masa nominal de 203 Da. Hex representa las hexosas de tipo galactosa (Gal), glucosa (Glc) o manosa (Man) con una masa nominal de 162 Da. NeuAc representa el ácido N-acetil neuramínico con una masa nominal de 291 Da. Neu5Gc representa el ácido N-glicolil neuramínico con una masa nominal de 307 Da.

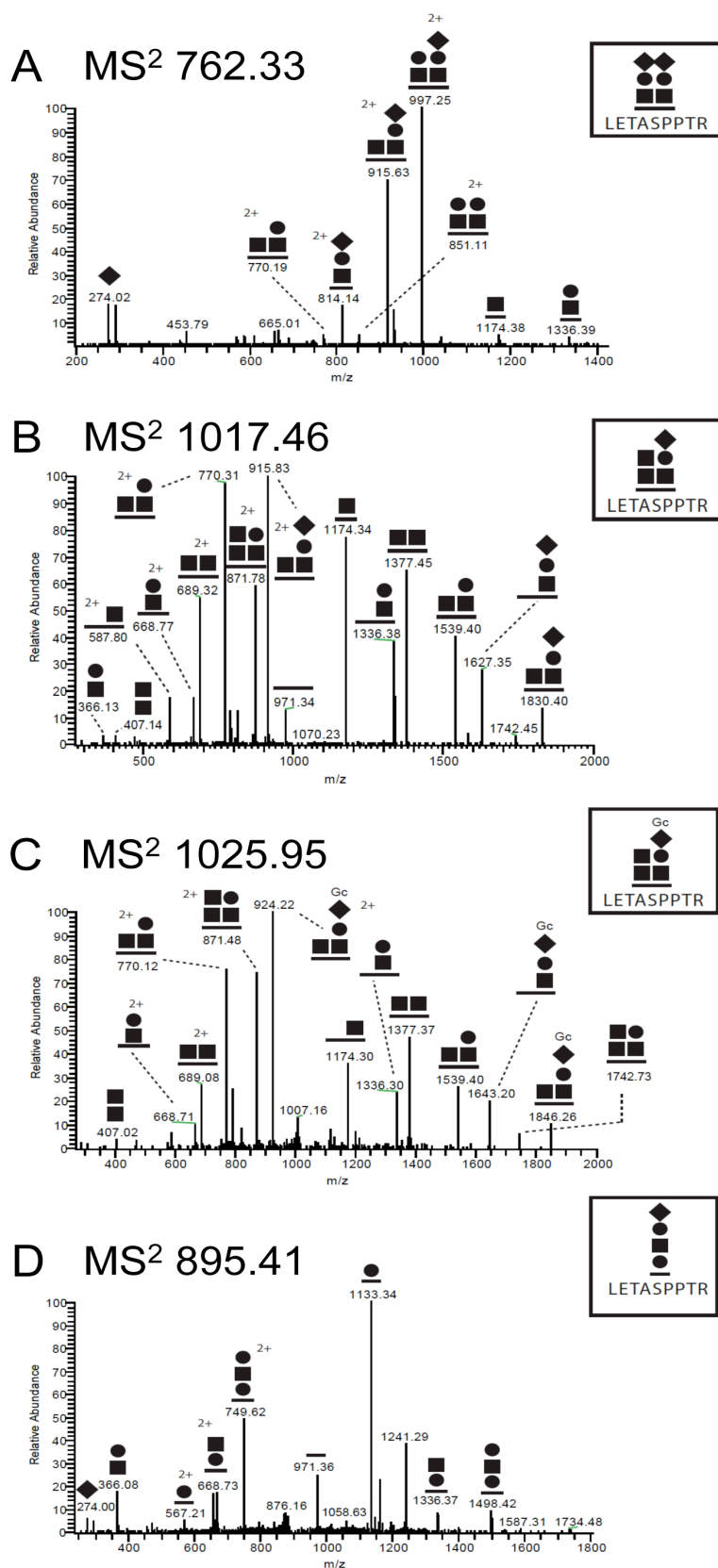


Figura 37. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” HexNAc-*O*-Ser/Thr presentes sobre el glicopéptido p469-477 (LETASPPTR). Los O-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.

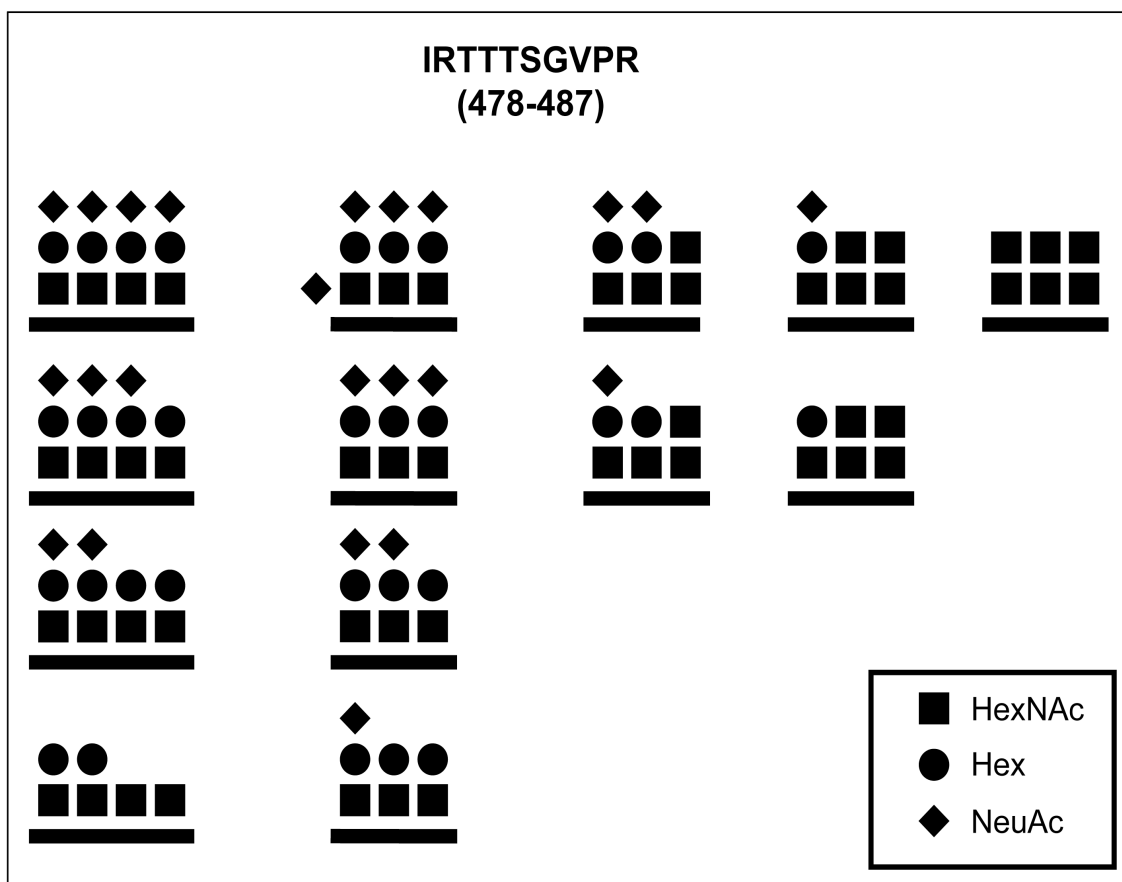


Figura 38. Representación esquemática de los O-glicanos presentes sobre el glicopéptido p478-487 (IRTTTSGVPR). Presenta modificaciones de tipo HexNAc-*O*-Ser/Thr, concretamente estructuras Hex-HexNAc-*O*-Thr que presentan ácido siálico (NeuAc) unido a la hexosa terminal, o estructuras Hex-HexNAc-*O*-Thr disialiladas, con un residuo de ácido siálico unido a la hexosa terminal y otro unido a la N-acetilhexosamina interna. También presenta estructuras de tipo HexNAc-HexNAc-*O*-Ser/Thr. HexNAc representa las N-acetilhexosaminas de tipo N-acetilglucosamina (GlcNAc) o N-acetilgalactosamina (GalNAc) con una masa nominal de 203 Da. Hex representa las hexosas de tipo galactosa (Gal), glucosa (Glc) o manosa (Man) con una masa nominal de 162 Da. NeuAc representa el ácido N-acetil neuramínico con una masa nominal de 291 Da.

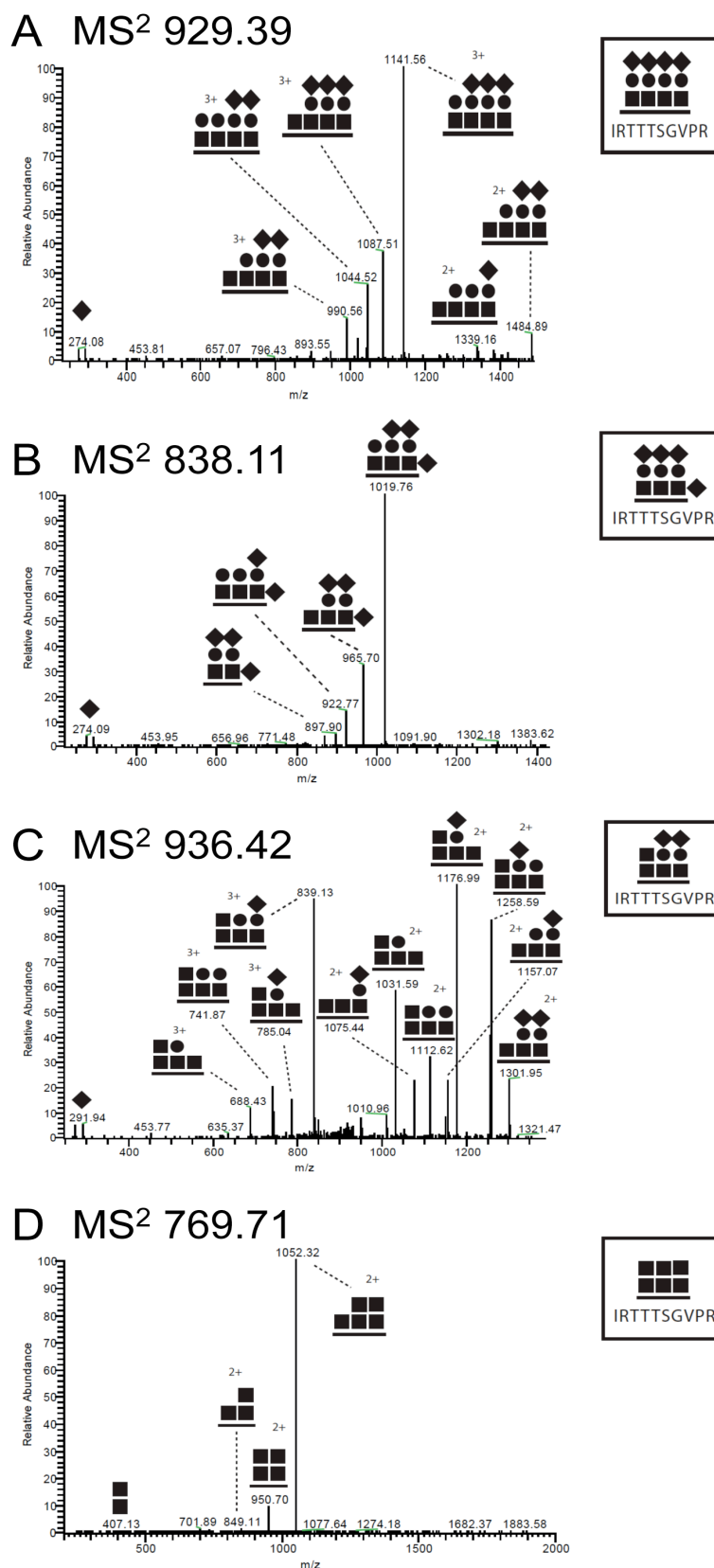


Figura 39. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” HexNAc-*O*-Ser/Thr presentes sobre el glicopéptido p478-487 (IRTTTSGVPR). Los *O*-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (*m/z*) de los iones precursores.

3.4. Purificación del α -dystroglicano nativo de células C2C12 carentes de *FKTN*

Con el fin de entender el papel que desempeña *FKTN* en el proceso de glicosilación del α -DG se llevó a cabo un abordaje de silenciamiento de la expresión del gen *FKTN* en células C2C12 mediante ARN de interferencia. Se aislaron 25 clones estables y en cada uno de ellos se analizó el nivel de expresión de *FKTN* mediante qRT-PCR, tanto en células diferenciadas (miotubos) como sin diferenciar (mioblastos). En ninguno de los clones obtenidos se detectó un nivel de interferencia superior al 90%.

A pesar de ello, se realizó la purificación del α -DG utilizando el clon estable que poseía el mayor porcentaje de interferencia, y que era del 85% en mioblastos y del 75% en miotubos (Figura 40). Como se puede observar en la Figura 40A, la eficiencia del silenciamiento del gen *FKTN* bajaba ligeramente durante el proceso de diferenciación.

El extracto proteico total, tanto de mioblastos como de miotubos en los cuales se había interferido la expresión de *FKTN*, se sometió a enriquecimiento con WGA-agarosa y posterior inmunoprecipitación con el anticuerpo anti- α -DG (DAG1 M01) que reconoce una secuencia peptídica del dominio N-terminal del α -DG de ratón. En este caso, en el proceso de inmunoprecipitación del α -DG se utilizó un anticuerpo que reconocía la zona proteica, ya que se desconocían los residuos glicosídicos que se verían afectados al silenciar el gen *FKTN*. Esto hacía que no fuera aconsejable el uso de los anticuerpos VIA4-1 o IIH6C4, ya que sus epítomos van dirigidos contra ciertos residuos glicosídicos aún desconocidos del α -DG.

El estado de glicosilación del α -DG purificado a partir del clon estable se analizó por Western blot, y como se puede observar en la Figura 40B no se vieron diferencias entre el tamaño molecular del α -DG procedente de la línea celular C2C12 silvestre y el α -DG purificado a partir de mioblastos o miotubos en los que se había silenciado la expresión de *FKTN*. En los tres casos se obtuvo una banda amplia alrededor de 120-140 kDa.

Este resultado fue contrastado por tinción con azul de Coomassie, donde se observó un tamaño molecular de 120-140 kDa correspondiente al α -DG correctamente glicosilado en los tres casos analizados (Figura 40C).

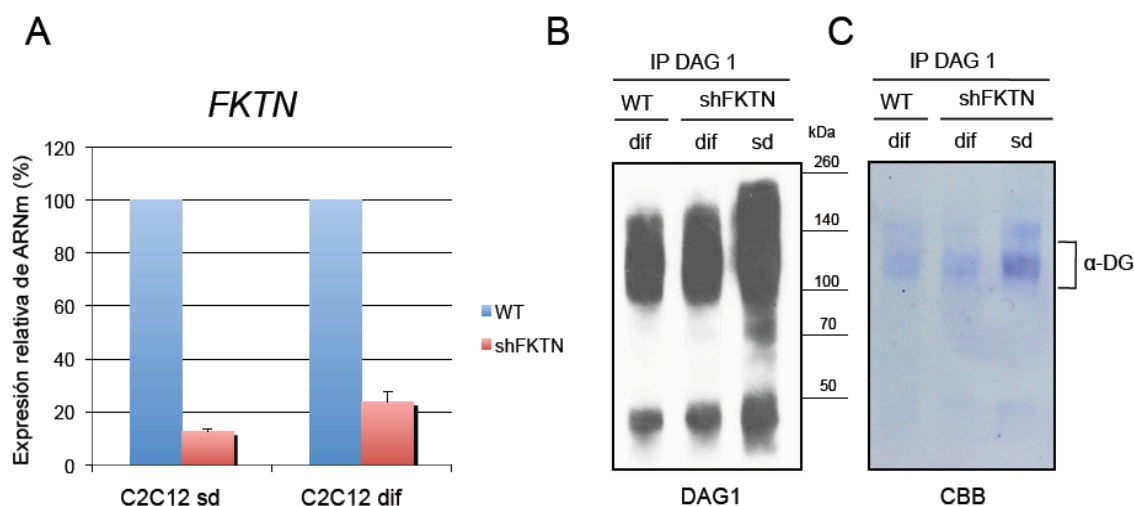


Figura 40. Purificación del α -DG de mioblastos y miotubos de ratón C2C12 tras el silenciamiento de la expresión del gen *FKTN*. (A) Análisis del nivel de expresión de *FKTN* en mioblastos (C2C12 sin diferenciar, sd) y miotubos (C2C12 diferenciados, dif) en los cuales se ha silenciado la expresión del gen *FKTN* mediante ARN de interferencia (shFKTN). Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos frente al control silvestre (WT). (B) Identificación por Western blot (con el anticuerpo DAG1 M01) del α -DG purificado mediante enriquecimiento con WGA-agarosa e inmunoprecipitación (IP) con el anticuerpo DAG1 M01. Se ha analizado la glicosilación del α -DG purificado a partir de mioblastos (carril 2) y miotubos (carril 3) de ratón con baja expresión de *FKTN*. Como control positivo se utilizaron glicoproteínas purificadas de un extracto de miotubos de ratón C2C12 silvestres (carril 1). (C) Identificación del α -DG altamente purificado mediante tinción con azul de Coomassie (CBB), donde se puede observar una banda amplia alrededor de 120-140 kDa que corresponde al α -DG correctamente glicosilado.

3.5. Purificación del α -distroglicano nativo de fibroblastos de piel procedentes de un paciente con síndrome de Walker-Warburg por mutaciones en el gen *FKTN*

Ya que el abordaje de silenciamiento génico no tuvo el resultado esperado, se adquirió del Instituto Coriell una línea celular de fibroblastos de piel procedente de un paciente con síndrome de Walker-Warburg. Este paciente se describió en un estudio publicado (Manzini et al., 2008) junto con otros 42 pacientes WWS, por tener distrofia muscular congénita, hipotonía, niveles elevados de CK y presencia de malformaciones cerebrales y oculares. Su genotipado indicó la presencia de dos mutaciones en heterocigosis en el gen *FKTN*. Sin embargo, en el trabajo original publicado no le fue analizado el estado de glicosilación del α -DG mediante Western blot o inmunotinción utilizando biopsia muscular del paciente.

Una vez adquirida la línea celular por nuestro laboratorio, se confirmó la presencia de las dos mutaciones descritas previamente el gen *FKTN* mediante análisis mutacional (Figura 41). La primera mutación era una delección de 1 pb en el exón 5, que

generaba un codón de parada prematuro en la posición 129 de la proteína (c.385delA, p.Ile129X) (Figura 41A). La segunda mutación descrita era una transición c.1176C>A en el exón 10, que predice la aparición de un codón de parada en la posición 392 (p.Tyr392X) (Figura 41B).

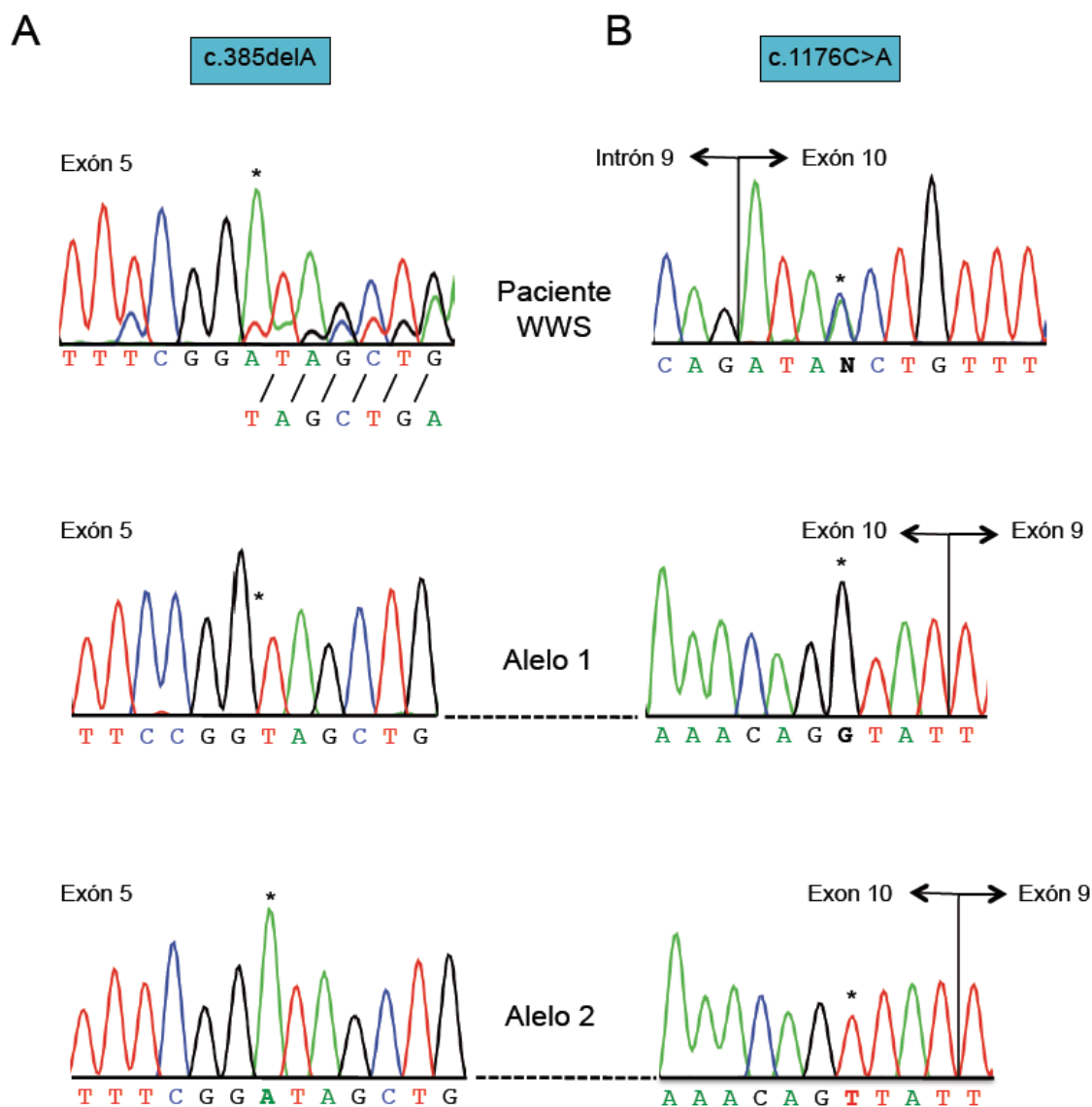


Figura 41. Análisis mutacional del gen *FKTN* en el paciente WWS. (A) La mutación existente en el exón 5 es una delección de 1 pb (c.385delA) que da lugar a un codón de parada prematuro p.Ile129X. (B) La mutación existente en el exón 10, c.1176C>A, genera un codón de parada prematuro p.Tyr392X. Se puede observar que la segregación de las mutaciones ha ocurrido de manera independiente, ya que un alelo lleva la mutación en el exón 5 y el otro en el exón 10.

A continuación se llevó a cabo la purificación del α -DG mediante enriquecimiento con WGA-agarosa y posterior inmunoprecipitación con el anticuerpo anti- α -DG (DAG1 MAB371) que reconoce una secuencia peptídica del dominio

C-terminal del α -DG humano. En este ensayo se utilizó un anticuerpo que reconocía una región peptídica del extremo C-terminal, ya que en humanos se pierde la región N-terminal del α -DG. El ensayo de Western blot empleando tanto el anticuerpo VIA4-1 como el anti- α -DG ($p\alpha$ DAG) reveló una correcta glicosilación del α -DG en la línea de fibroblastos de WWS comparado con las líneas de fibroblastos de piel humana normales (Figura 42A y B) o la línea celular HEK293T (Figura 42C).

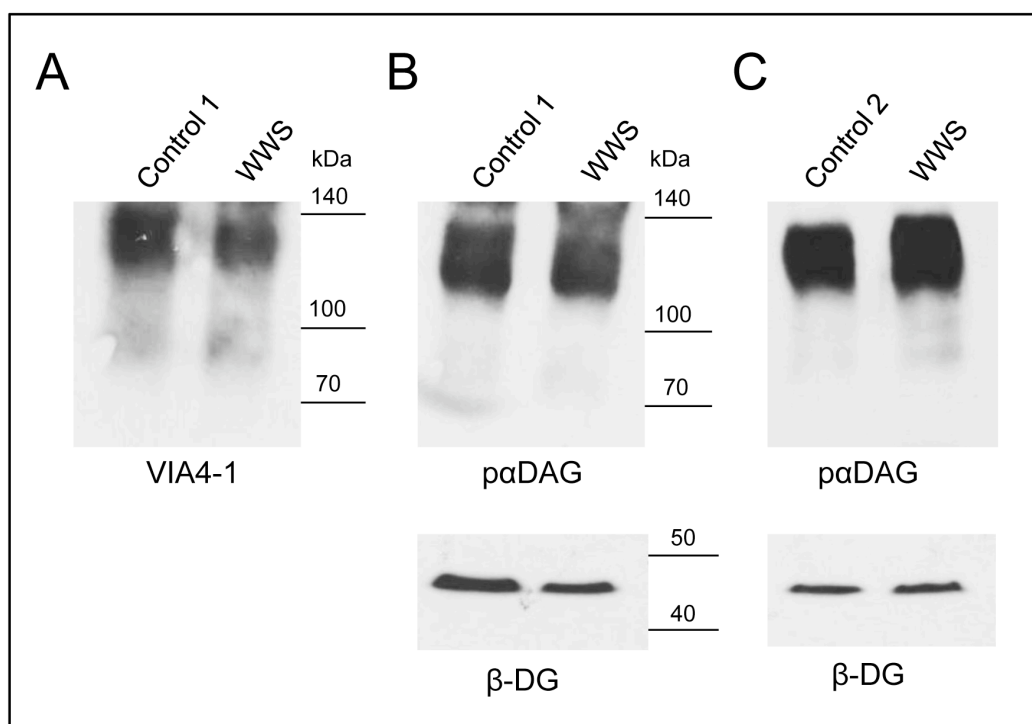


Figura 42. Identificación del α -DG purificado a partir de fibroblastos de piel del paciente WWS. (A) Western blot con el anticuerpo VIA4-1, empleando glicoproteínas purificadas de fibroblastos del paciente WWS (carril 2). Como control se utilizó una línea celular de fibroblastos de piel normal (control 1). (B) Western blot con el anticuerpo $p\alpha$ DAG, empleando glicoproteínas purificadas de fibroblastos del paciente WWS (carril 2). Como control se utilizó una línea celular de fibroblastos de piel normal (control 1). (C) Western blot con el anticuerpo $p\alpha$ DAG, empleando glicoproteínas purificadas de fibroblastos del paciente WWS (carril 2). Como control se utilizó la línea celular HEK293T (control 2). En los tres casos la purificación del α -DG se realizó mediante enriquecimiento con WGA-agarosa y posterior inmunoprecipitación con el anticuerpo DAG1 MAB371. También se observa una correcta expresión del β -DG tanto en el paciente WWS como en los dos controles empleados.

Dado que el resultado obtenido no cumplía las expectativas, y conociendo que en el trabajo inicial de caracterización del paciente no se había analizado la segregación de las dos mutaciones por falta de ADN parental, nos planteamos la posibilidad de que dichas mutaciones pudieran afectar a un solo alelo. De esta manera se podría explicar la

falta de hipoglicosilación del α -DG en esta línea celular, ya que un solo alelo normal sería suficiente para la correcta glicosilación de la proteína.

Con el fin de comprobar la localización de las dos mutaciones se diseñó una pareja de oligonucleótidos que amplificase una zona que abarcase desde el principio del exón 5 hasta el final del exón 10. De esta manera los dos exones se amplificaban conjuntamente y se podía comprobar si las dos mutaciones se hallaban en alelos distintos o no.

La amplificación se realizó utilizando como molde el ADNc obtenido mediante RT-PCR a partir de ARN total extraído de la línea de fibroblastos del paciente.

Como se puede observar en la Figura 41, el análisis mutacional reveló que la segregación de las mutaciones había ocurrido de manera independiente, ya que un alelo lleva la mutación en el exón 5 y el otro en el exón 10.

En vista de las dificultades surgidas para obtener un sistema celular carente de *FKTN* que nos pudiese ofrecer la posibilidad de estudiar, mediante análisis glicoproteómico, la función que desempeña esta proteína en el proceso de glicosilación del α -DG, se está poniendo en marcha la generación de una línea celular C2C12 KO para *FKTN*.

Para ello se va a emplear una nueva tecnología que permite editar el genoma, y que consiste en el uso de las nucleasas TAL (TALEN, transcription activator-like effector nucleases).

Las proteínas TAL representan una familia de factores de virulencia producidos por el patógeno de plantas *Xanthomonas sp.* En las plantas infectadas por este patógeno, los factores TAL se unen a secuencias promotoras específicas que regulan, tanto positiva como negativamente, genes relacionados con el proceso patológico (Figura 43). Las TALENs forman dímeros mediante unión a dos secuencias diana separadas por 16 nucleótidos. Entre los dos sitios de unión se produce la dimerización de los dominios catalíticos FokI que actúan como unas tijeras realizando cortes de doble cadena. Normalmente, los cortes de doble cadena se reparan mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ, nonhomologous end-joining), dando lugar a pequeñas deleciones y en consecuencia a un KO funcional del gen.

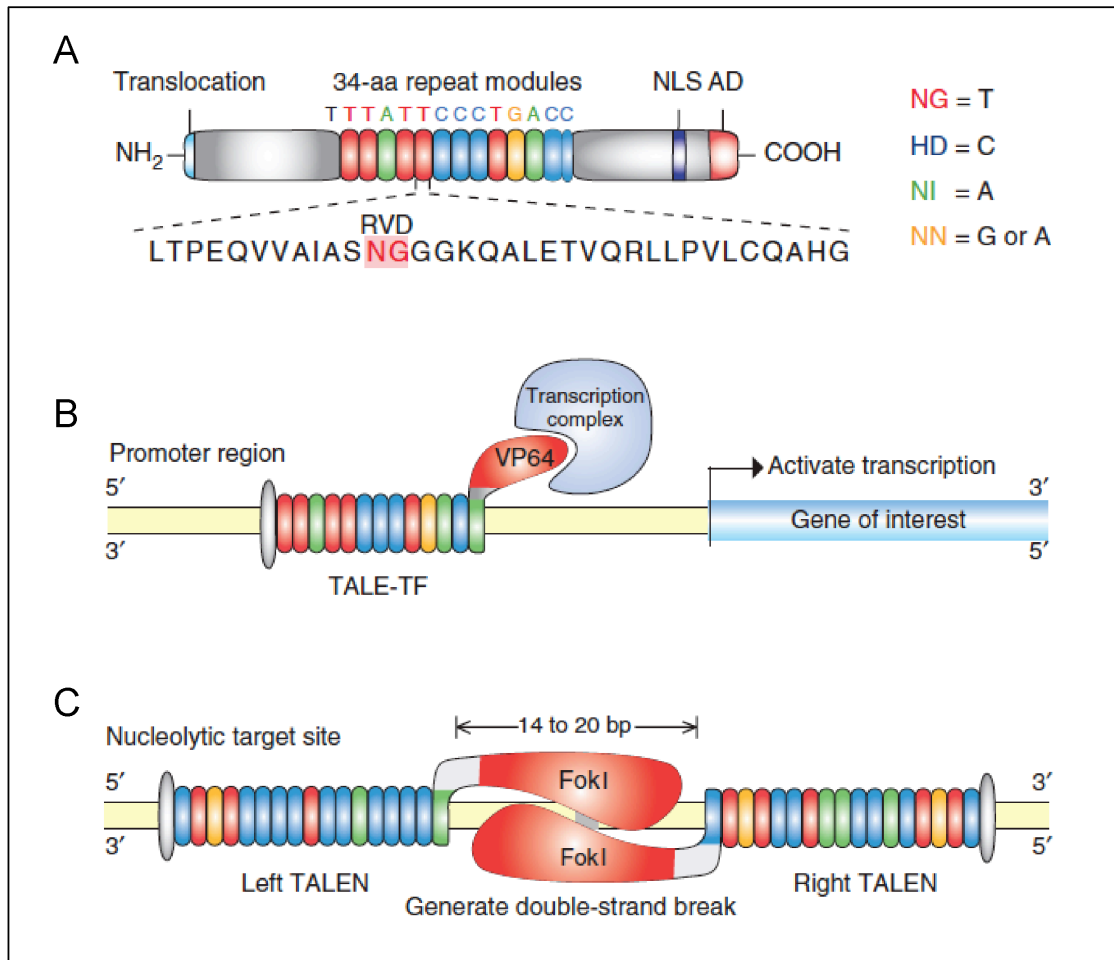


Figura 43. Estructura y mecanismo de acción de las proteínas TALEs. (A) Estructura de las proteínas TALEs derivadas de *Xantomonas* sp. Cada módulo de unión a ADN contiene 34 aminoácidos, donde la secuencia RVDs (repeat variable diresidues), localizada entre las posiciones 12 y 13 de cada repetición, determina el nucleótido diana en el ADN. El código de reconocimiento es: NG=T, HD=C, NI=A y NN=G o A. Los módulos de unión a ADN están flanqueados por extremos N- y C-terminales que contienen dominios de translocación, de localización nuclear (NLS) y de activación de la transcripción (AD). (B) Mecanismo de activación transcripcional. Las proteínas TALE se pueden emplear para generar factores de transcripción (TALE-TFs) que pueden modular la transcripción de genes endógenos. El dominio TALE de unión a ADN está fusionado con un activador transcripcional sintético VP64, que recluta la ARN polimerasa y otros factores de transcripción implicados en la iniciación de la transcripción. (C) Mecanismo de generación de KO funcional. Las proteínas TALE se pueden emplear para generar cortes de doble cadena sitio específicos, facilitando la edición del genoma mediante reparación homóloga o no homóloga. Las dos subunidades TALE (TALE derecha y TALE izquierda) reconocen una pareja de sitios de unión en el ADN (sitio derecho y sitio izquierdo de unión), y entre los dos sitios existe un espaciador de 16 nucleótidos. Cada subunidad reconoce una de las cadenas de ADN (TALE izquierdo reconoce la cadena directa y TALE derecho reconoce la cadena reversa). Cada dominio TALE de unión a ADN está fusionado con el dominio catalítico de la endonucleasa de restricción FokI. Cuando los dos dominios catalíticos FokI dimerizan, se produce el corte en el ADN en la región situada entre los dos sitios de unión TALE.

Discusión

La reducción de la capacidad de unión a ligandos del α -DG, debido a procesos defectuosos de O-glicosilación, da lugar a un grupo muy heterogéneo de distrofias musculares asociadas con patologías del sistema nervioso central denominadas distroglicanopatías. Las distroglicanopatías incluyen WWS, MEB, FCMD, MDC1C, MDC1D y fenotipos suaves de LGMD tipo 2 con o sin afectación cerebral. Hasta la fecha se conocen 10 genes afectados (*POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN*, *FKRP*, *LARGE*, *DAG1*, *DPM2*, *DPM3* y *DOLK*) que están directa o indirectamente implicadas en la aparición de este tipo de enfermedades. Todos estos genes son responsables de aproximadamente el 50% de los casos con defectos en la O-glicosilación del α -DG. La causa genética y el defecto bioquímico asociado con el 50% restante todavía se desconoce (Godfrey et al., 2011).

En el presente trabajo describimos alteraciones en el gen *POMGNT1* en dos pacientes con distroglicanopatía y con cuadros clínicos muy distintos, uno con fenotipo grave (MEB) y otro con fenotipo leve (LGMD), poniendo de manifiesto la variabilidad fenotípica asociada con mutaciones en este gen.

1. Caracterización histológica y bioquímica de los pacientes

El paciente MEB presentaba una combinación de anomalías cerebrales y oculares asociadas con debilidad muscular generalizada, hipotonía marcada y retraso global del desarrollo (sección 1 de “Materiales”). Su capacidad funcional era limitada ya que no podía sentarse ni mantener el control de la cabeza. Estas características son típicas para pacientes MEB graves, mientras que en los casos leves se pueden adquirir habilidades motoras (Teber et al., 2008, Demir et al., 2009).

El examen histológico de la biopsia muscular del paciente reveló sólo cambios miopáticos sutiles y una ligera variación en el tamaño de las fibras (Figura 6), lo que era un tanto sorprendente teniendo en cuenta la severidad fenotípica presentada por el paciente. Los cambios distróficos leves se han descrito normalmente en pacientes MEB con síntomas menos graves y que presentaban una mejoría de su capacidad funcional llegando a adquirir actividad ambulatoria independiente (Demir et al., 2009).

En cambio, el análisis histológico de la biopsia muscular del paciente LGMD20 reveló cambios consistentes con una distrofia muscular (Figura 6). La distrofia muscular está presente en todos los pacientes con distroglicanopatía y viene indicada tanto por niveles elevados de la CK sérica, como por signos de distrofia muscular tras el examen histológico de las biopsias musculares, incluyendo la presencia de necrosis, fibrosis y

fibras regenerativas (Martin, 2006). Teniendo en cuenta los cambios histopatológicos mínimos detectados en la biopsia muscular del paciente MEB, la hipotonía grave y la debilidad muscular generalizada observadas podrían deberse a la severa disfunción cerebral.

El diagnóstico de distroglicanopatías se establece inicialmente en base a la detección del α -DG hipoglicosilado en el sarcolema de las fibras musculares esqueléticas mediante inmunotinción y/o ensayo de Western blot. La O-glicosilación defectuosa del α -DG representa la base molecular de las distroglicanopatías, ya que el α -DG hipoglicosilado se uniría de manera débil a ligandos como la laminina, desestabilizando la unión entre la célula muscular y la matriz extracelular (Michele and Campbell, 2003). Existen sólo dos anticuerpos monoclonales comerciales que permiten analizar el estado de glicosilación del α -DG: IIH6C4 (anticuerpo que además bloquea la unión a la laminina) y VIA4-1 (Ervasti and Campbell, 1991, Ervasti and Campbell, 1993). Mediante el uso de estos anticuerpos se ha detectado la ausencia de glicosilación del α -DG en el paciente MEB (Figura 7A) y una hipoglicosilación del α -DG en el paciente LGMD2O (Figura 8A). Sin embargo, la inmunotinción de la biopsia muscular del paciente MEB empleando el anticuerpo p α DAG (Figura 7B) mostró una correcta localización del α -DG en la membrana sarcoplásmica. Como se puede observar en la Figura 8E y 8F, el β -DG y la laminina no se encontraron afectados en el paciente MEB. De manera similar, para el paciente LGMD2O, la inmunorreactividad para β -DG, merosina y distrofina fue normal (datos no mostrados), descartando otros tipos de distrofias musculares como la distrofia muscular congénita tipo 1A (CMD1A) causada por mutaciones en la merosina o la distrofia muscular de Duchenne causada por mutaciones en la distrofina.

En el caso del paciente MEB, la ausencia de glicosilación del α -DG está en concordancia con la correlación descrita entre la débil inmunotinción del α -DG en la biopsia muscular y la severidad fenotípica de los pacientes que llevan mutaciones en los genes *POMT1*, *POMT2* y *POMGNT1*. En cambio, esta correlación no se aplica a mutaciones en *FKTN* y *FKRP*, donde los fenotipos leves como las distrofias de cinturas sin afectación cerebral (LGMD2M y 2I) pueden presentar, en algunos casos, ausencia total de glicosilación del α -DG. Así mismo, puede ocurrir el caso contrario de un fenotipo severo asociado con una leve deficiencia del α -DG glicosilado (Jimenez-Mallebrera et al., 2009, Vuillaumier-Barrot et al., 2009).

Por otro lado, en el caso del paciente LGMD2O, ya que se trata de un fenotipo más suave sin anomalías estructurales cerebrales, oculares y sin retraso mental (sección 1 de “Materiales”), el análisis inmunohistológico evidenció un patrón en mosaico de fibras musculares positivas y negativas para el anticuerpo IIH6C4 como se había descrito previamente en varios pacientes LGMD2I con mutaciones en el gen *FKRP* (Brown et al., 2004) y en un paciente con CMD-MR debido a mutaciones en el gen *POMT1* (Jimenez-Mallebrera et al., 2009).

2. Caracterización genética de los pacientes

En los dos pacientes analizados se han encontrado mutaciones en el gen *POMGNT1* (apartado 1.2. de “Resultados”).

2.1. Paciente MEB

El análisis mutacional reveló la presencia de dos mutaciones en heterocigosis en el gen *POMGNT1* (Figura 10). La primera mutación c.1469G>A, que predice la sustitución p.Cys490Tyr, se había descrito previamente en varios pacientes con distroglicanopatías (Tabla 17) (Diesen et al., 2004, Biancheri et al., 2006, Godfrey et al., 2007, Devisme et al., 2012). La segunda mutación se describe por primera vez en este trabajo y consiste en una delección de 1 pb (c.1545delC; p.Tyr516Thrfs21*) que genera un cambio en el marco de lectura, dando lugar a un codón de parada prematuro que conlleva la pérdida de los últimos 125 aminoácidos. Los dos nucleótidos afectados se sitúan en el dominio catalítico de la proteína (Figura 44).

Mientras que la nueva mutación, p.Tyr516Thrfs21*, da lugar a una proteína truncada, el otro cambio, p.Cys490Tyr, afecta a un residuo conservado implicado, según la estructura cristalina de GnTI, en la formación de un puente disulfuro con el residuo Cys421 (Yoshida et al., 2001). Recientemente se ha descrito la caracterización bioquímica de 14 mutantes de *POMGNT1* que contenían alteraciones descritas previamente en pacientes MEB y en otras patologías como WWS y FCMD (Voglmeir et al., 2011). Se ha observado una bajada acentuada de la actividad enzimática del mutante p.Cys490Tyr, sugiriendo que los dos residuos (Cys421 y Cys490), implicados en la formación del puente disulfuro, son esenciales para la función catalítica de POMGNT1. Teniendo en cuenta que la mutación p.Cys490Tyr se ha descrito en pacientes con distroglicanopatías graves de tipo MEB/FCMD y en fetos con lisencefalia tipo II,

postulamos que esta alteración podría estar asociada preferentemente con patologías graves.

Tabla 17. Resumen de los pacientes con distroglicanopatía descritos hasta la fecha como portadores de la mutación p.Cys490Tyr.

Paciente	Posición en el ADN	Posición en la proteína	Hom/Het	Fenotipo
1	c.1469G>A + ?	p.Cys490Tyr + ?	Het+?	MEB
2, 3	c.1469G>A c.1769G>A	p.Cys490Tyr p.Trp590X	Het	MEB
4, 5	c.1469G>A	p.Cys490Tyr	Hom	MEB
6	c.594C>G c.1469G>A	p.Ser198Arg p.Cys490Tyr	Het	MEB
7	c.652+1G>A c.1469G>A	p.(?) p.Cys490Tyr	Het	MEB/FCMD
8, 9	c.1469G>A	p.Cys490Tyr	Hom	Fetos con Lisencefalia II
10	c.1469G>A c.639C>T	p.Cys490Tyr p.Asp179fs	Het	Feto con Lisencefalia II
11*	c.1469G>A c.1545delC	p.Cys490Tyr p.Tyr516Thrfs*21	Het	MEB

Hom: homocigosis, Het: heterocigosis. *: en esta tesis.

2.2. Paciente LGMD2O

El análisis mutacional del paciente LGMD2O reveló la presencia de una duplicación de 9 pb (-83_-75dup) en homocigosis en la región promotora del gen *POMGNT1*, siendo la primera vez que se describe una alteración en la región promotora en uno de los genes implicados directa o indirectamente en la glicosilación del α -DG. Con el fin de analizar la implicación de la nueva mutación en la funcionalidad del promotor del gen *POMGNT1*, se ha llevado a cabo la identificación del promotor proximal y de sus elementos reguladores, y posteriormente la caracterización funcional de la mutación -83_-75dup.

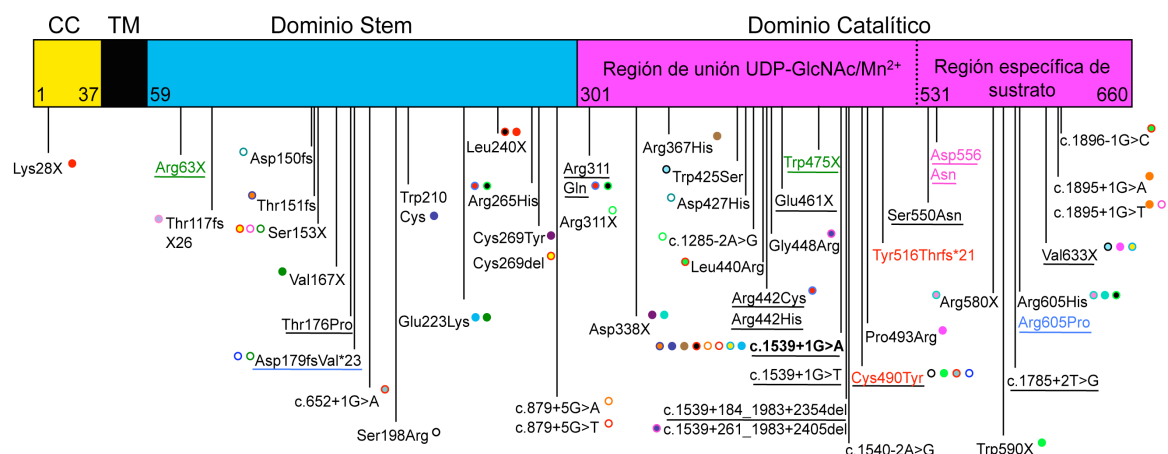


Figura 44. Representación de las mutaciones descritas en *POMGNT1*. En negro se indican las mutaciones que dan lugar a MEB, en verde las que dan lugar a WWS, en rosa fucsia las que dan lugar a LGMD2O, en azul las que dan lugar a CMD y en rojo se muestran las mutaciones descritas en este trabajo, en el paciente MEB. Las mutaciones homocigotas están indicadas mediante subrayado, y las mutaciones heterocigotas están indicadas mediante parejas de círculos. La mutación Asp179fsVal*23, que da lugar a dos fenotipos distintos, se ha subrayado en azul, ya que en forma homocigota da lugar a CMD y en forma heterocigota, junto con otras mutaciones como Arg311X y Cys490Tyr, da lugar a MEB. CC, cola citoplásmica; TM, dominio transmembrana.

3. Caracterización funcional de la región promotora del gen *POMGNT1*

El análisis de la actividad transcripcional del promotor de *POMGNT1*, utilizando construcciones conteniendo secuencias del promotor delecionadas gradualmente tanto por su extremo 5' como por 3', se ha realizado con el fin de evaluar la importancia de cada región, según la posible existencia de elementos reguladores a lo largo de dicha secuencia. La construcción (-402/+644) mostró el nivel máximo de actividad transcripcional comparado con las otras construcciones empleadas, lo que sugiere la existencia, en esta zona, de sitios de unión de factores de transcripción críticos para la actividad de este gen. La eliminación de las regiones (+148/+644) y (+25/+148) generó un descenso considerable en la actividad transcripcional lo que indicaba también la presencia, en estas regiones, de elementos esenciales para la regulación génica.

El promotor de *POMGNT1* no posee cajas generales de inicio de transcripción de tipo TATA o CAAT, en cambio posee una isla CpG de 440 pb en la región (-198/+219), que cumple el criterio de definición de islas CpG. El análisis *in silico* del promotor de *POMGNT1* reveló la presencia de numerosos sitios consenso predichos de unión de factores de transcripción como v-Myb, MZF1, Sp1, GATA, Ets-1, AML-1A, NF-kB/c-Rel y Lyf-1. Del análisis *in silico* cabe destacar la presencia de varios sitios de

unión para Sp1. Sp1 es un factor de transcripción implicado en los mecanismos basales de inicio de transcripción de genes carentes de cajas TATA y CAAT, que son normalmente genes con expresión ubicua. Tanto *POMGNT1* como los otros genes implicados en la glicosilación del α -DG son genes con expresión ubicua y sus regiones promotoras contienen islas CpG predichas. Este hecho apunta hacia un mecanismo de regulación común, lo que sería lógico teniendo en cuenta que estos genes participan en el mismo proceso de glicosilación del α -DG. Además, se ha demostrado que el promotor del gen *Dagl* está activado funcionalmente mediante la unión de Sp1, demostrándose la importancia de esta interacción para la fisiología del distroglicano (Rettino et al., 2009).

La unión de Sp1 a los sitios predichos localizados en la región (-402/+644) se comprobó *in vitro* mediante ensayos de retardo y super-retardo en la movilidad electroforética. De esta manera se caracterizó la existencia de tres sitios funcionales de unión de Sp1 en las posiciones -318/-310, +13/+19 y +28/+34. La unión *in vivo* de Sp1 a estos tres sitios se demostró por ensayos de inmunoprecipitación de cromatina. Sp1 pertenece a una familia de factores de transcripción que contienen dominios de unión al ADN de tipo dedos de zinc y que se unen a secuencias ricas en GC de tipo 5'-GGGCGG-3' o 5'-CACCC-3' (Smale et al., 1990). Estos factores de transcripción están implicados en muchos procesos fisiológicos como regulación del ciclo celular, activación mediante hormonas, apoptosis y angiogénesis. Además, la unión de Sp1 protege a las islas CpG de procesos de metilación *de novo* (Brandeis et al., 1994). En muchos promotores carentes de cajas TATA, la unión de Sp1 está íntimamente relacionada con la determinación del sitio de iniciación de la transcripción (Jolliff et al., 1991). Dos de los sitios de unión de Sp1 del promotor de *POMGNT1* están localizados cerca del TSS, lo que demuestra su importancia para el reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción.

Otro factor de transcripción potencialmente implicado en la regulación transcripcional del gen *POMGNT1* es Ets-1. El ensayo de retardo en gel confirmó su unión *in vitro* a uno de los dos sitios predichos dentro de la región promotora (-402/+644), en concreto la región (+2/+8). Todos los miembros de la familia Ets (hasta la fecha en humanos se han descrito 27 miembros) contienen una secuencia conservada denominada dominio Ets que reconoce una secuencia conservada 5'-GGAA/T-3' (Donaldson et al., 1994). Los factores Ets regulan positiva o negativamente la expresión de genes implicados en distintos procesos biológicos como el control de la proliferación

celular, diferenciación, hematopoyesis, apoptosis, metástasis, remodelación tisular, angiogénesis y transformación (Li et al., 2000). La actividad funcional de los factores Ets está modulada por la interacción con otros factores de transcripción como Sp1/Sp3, AP1 (Activator protein-1) y SRF (Serum response factor protein) (Sharrocks, 2001). La actividad transcripcional del promotor de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) está regulada por un complejo ternario formado por los factores Sp1, Ets-1 y Tax. Todos estos datos apuntan hacia una cooperación entre Sp1 y Ets-1 para la activación transcripcional del promotor de *POMGNT1*, así como se ha descrito para otros genes como *colágeno $\alpha 2(I)$* (Czuwara-Ladykowska et al., 2001) y *tetraespan* (Hernandez-Torres et al., 2001).

En la región promotora (+233/+241) se detectó la unión *in vitro* de un factor GATA mediante ensayos de retardo en gel. No se ha podido determinar *in vivo*, mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, cuál de los miembros de la familia GATA es responsable de la regulación transcripcional del gen *POMGNT1* ya que no se disponía de toda la batería de anticuerpos. El único anticuerpo disponible fue el anticuerpo anti-GATA-1, y cuyo uso en ensayos de super-retardo permitió descartar a este factor como regulador de la actividad transcripcional del promotor de *POMGNT1*, ya que no se detectó ninguna interacción con los complejos proteicos que se encontraban unidos a la secuencia estudiada en el promotor. Probablemente otros componentes de la familia GATA son responsables de la activación transcripcional de este promotor. La familia de factores de transcripción GATA está compuesta por seis miembros que contienen un dominio conservado de unión a ADN implicado en el reconocimiento de una secuencia nucleotídica de tipo 5'-(A/T)GATA(A/G)-3'. Los factores de transcripción GATA-1, -2 y -3 se expresan abundantemente en células hematopoyéticas, donde controlan varios aspectos relacionados con la hematopoyesis (Orkin, 1992). Además de su expresión en células del sistema hematopoyético, los tres factores GATA se expresan en varios órganos y células como testículo (GATA-1), células epiteliales (GATA-2), neuronas (GATA-2 y -3), y riñón y glándula mamaria (GATA-3). Los factores GATA-4, -5 y -6 se expresan en tejidos derivados del endodermo y del mesodermo y controlan procesos críticos como el desarrollo del corazón, del hígado y del pulmón (Charron and Nemer, 1999).

Los datos presentados en esta tesis representan la primera caracterización funcional del promotor de *POMGNT1* y demuestran la importancia de los factores de transcripción Sp1, Ets-1 y GATA en la activación transcripcional del gen *POMGNT1*.

4. Caracterización funcional de la mutación -83 -75dup encontrada en el paciente LGMD2O

Una vez definido el promotor proximal del gen *POMGNT1* silvestre, se llevó a cabo el estudio funcional del promotor que llevaba la duplicación de 9 pb (-83_-75dup) con el fin de comprobar si esta mutación era responsable del fenotipo presentado por el paciente LGMD2O. Se observó una reducción de los niveles de ARNm y proteína POMGNT1 compatible con una baja actividad transcripcional del promotor mutante, probablemente debido a la fuerte unión del represor transcripcional ZNF202. Sorprendentemente, el factor de transcripción ZNF202 no se unía *in vitro* al promotor silvestre, el cual presentaba un único sitio predicho de unión. En cambio, interaccionaba con el promotor mutante que presentaba un sitio adicional de unión generado por la duplicación de 9 pb. Esta hipótesis está apoyada por los estudios *in vitro* que indican una fuerte unión de este represor a repeticiones directas de su secuencia consenso de unión 5'-GGGGT-3'. Estas repeticiones directas se encuentran en los promotores de muchos genes implicados en el metabolismo de lípidos como la apolipoproteína (*Apo*) *AIV*, *ApoC-III*, *ApoE* y la lipoproteína lipasa (*LPL*), y también en genes esenciales para el mantenimiento de los vasos sanguíneos como *VEGF* (Wagner et al., 2000). Además, la sobreexpresión de ZNF202 en macrófagos reprime, de manera dependiente de dosis, la actividad transcripcional de los genes *ABCA1* y *ABCG1* que presentan en sus regiones promotoras motivos GnT (5'-GGGGT-3') (Porsch-Ozcurumez et al., 2001). El factor de transcripción ZNF202 se identificó inicialmente como una proteína específica de testículo (Monaco et al., 1998), pero posteriormente se determinó que presentaba una expresión ubicua en tejidos humanos adultos y fetales, con una presencia abundante en corazón, pulmón, hígado y testículo (Porsch-Ozcurumez et al., 2001).

Funcionalmente, el factor ZNF202 contiene un dominio de oligomerización SCAN (SER-ZBP, CT-finS1, AW-1, Number 18), un dominio de represión KRAB (**K**ruppel-associated **b**ox) y ocho motivos de unión a ADN de tipo dedos de zinc (Urrutia, 2003). La represión está mediada por el dominio KRAB que interacciona con el correpresor KAP-1 (**K**RAB-associated-protein-1) que actúa como andamiaje ("scaffold") para otros integrantes del complejo represor como la proteína HP1 (**h**eterochromatin **p**rotein 1), las deacetilasas de histonas y la SETDB1, que es una proteína que metila la lisina 9 de la histona H3. Las proteínas HP1 tienen la capacidad de unirse a esta lisina metilada para condensar la cromatina (Nielsen et al., 1999, Ryan

et al., 1999). De esta manera se induce la formación de cromatina inactiva, probablemente en conjunto con un mecanismo de represión directa que implica la interferencia con el ensamblaje de la maquinaria de transcripción. (Wagner et al., 2000).

5. Caracterización glicoproteómica del α -dystroglicano nativo de ratón

Aunque se sabe que la glicosilación extensiva y heterogénea presente en el α -DG es esencial para su funcionalidad, se desconoce todavía la composición completa de todos los O-glicanos presentes en el α -DG y sus sitios de unión. Recientemente se ha descrito la caracterización glicoproteómica del α -DG de músculo esquelético humano y también de conejo, estableciéndose los sitios específicos de O-glicosilación en ambos.

La caracterización del α -DG de músculo esquelético humano reveló la presencia de 25 glicopéptidos que pertenecían a cinco péptidos trípticos del dominio de tipo mucina. Cuatro de esos péptidos presentaban una gran heterogeneidad de O-glicanos de tipo mucina, mientras que el péptido que contiene los sitios de O-glicosilación Thr367 y Thr369 presentaban exclusivamente O-manosilglicanos con o sin residuos de ácido siálico (Nilsson et al., 2010). En cambio, para el α -DG de músculo esquelético de conejo se caracterizaron 91 glicopéptidos dentro de la región de mucinas y se identificaron 9 sitios de O-manosilación y 14 sitios que presentaban uniones O-GalNAc (Stalnakker et al., 2010). Así mismo, se ha reportado la caracterización de los O-glicanos del α -DG recombinante de ratón, expresado y purificado a partir de células humanas HEK293T, identificándose 14 secuencias peptídicas y 38 glicopéptidos que presentaba un alto grado de heterogeneidad en cuanto a su composición (Harrison et al., 2012).

En esta tesis doctoral se ha llevado a cabo la purificación del α -DG nativo de ratón utilizando la línea celular de mioblastos de ratón C2C12, y se han identificado los O-glicanos presentes en el dominio de tipo mucina de la proteína, determinándose la composición de los mismos y su sitio de unión. Se ha optado por no utilizar un sistema celular que expresase un α -DG recombinante para evitar la detección de posibles modificaciones postraduccionales debidas a la sobreexpresión de la proteína. Se ha elegido la línea celular de mioblastos de ratón C2C12 debido a que el músculo es el principal órgano afectado en los pacientes con dystroglicanopatía. Los ensayos de qRT-PCR revelaron un aumento de los niveles de expresión del gen *Dag1* durante el proceso de diferenciación de los mioblastos a miotubos, lo que determinó la elección de los miotubos para la purificación del α -DG nativo. Se ha descrito previamente que la

expresión del gen *Dag1* en la línea celular C2C12 está regulada por cambios en el estado de metilación de su promotor (Rettino et al., 2009). El promotor de *Dag1*, que contiene una isla CpG de 822 pb, se encuentra metilado en las células musculares sin diferenciar (mioblastos) y durante el proceso de diferenciación a miotubos sufre un proceso de demetilación, lo que podría explicar el aumento en la expresión del gen *Dag1* en miotubos. En efecto, las células musculares que se hallan en proceso de diferenciación sufren una pérdida a gran escala de la metilación del ADN seguido por una remetilación gradual (Jost and Jost, 1994, Le et al., 1994), y varios genes musculares, como MyoD, sufren una demetilación general durante la diferenciación (Brunk et al., 1996).

En este trabajo se han identificado un total de 16 secuencias peptídicas distintas y 66 glicopéptidos que corresponden al α -DG nativo purificado a partir de miotubos de ratón C2C12. Dos de los péptidos identificados corresponden a la región N-terminal y es la primera vez que se identifican mediante análisis glicoproteómico péptidos correspondientes a esta región. En todos los análisis similares descritos hasta la fecha no se han detectado secuencias peptídicas correspondientes a esta región, probablemente debido al procesamiento postraducciona mediado por la convertasa furina que elimina el dominio N-terminal (Barresi and Campbell, 2006). De hecho, este dominio, con un peso molecular de 38 kDa, se ha detectado tanto en el medio de cultivo de distintas líneas celulares como en el suero humano normal (Saito et al., 2008) y el líquido cerebroespinal (Hesse et al., 2011).

Los 66 glicopéptidos identificados pertenecen a 5 secuencias peptídicas (p358-369, p450-459, p460-468, p469-477, p478-487) del dominio de tipo mucina y suman un total de 13 sitios potenciales de glicosilación. Uno de los 5 péptidos (p358-369) presentaba O-manosilglicanos unidos a residuos de treonina (**Man-O-Thr**), mientras que los otros 4 péptidos (p450-459, p460-468, p469-477, p478-487) presentaban O-glicanos de tipo mucina (**GalNAc-O-Ser/Thr**). No se han detectado péptidos correspondientes a las regiones Gln311-Arg357 y Thr370-Lys449. Los 47 aminoácidos que constituyen la región Gln311-Arg357 contienen 11 sitios potenciales de O-glicosilación y 13 residuos de prolina (Pro), mientras que la región Thr370-Lys449 contiene 27 sitios potenciales de glicosilación y 14 residuos de Pro. La falta de detección de glicopéptidos correspondientes a estas dos regiones podría deberse a una digestión incompleta causada por la glicosilación densa de estas regiones y que podría haber impedido el acceso de la tripsina al sustrato peptídico. En efecto, el

análisis del dominio extracelular del distroglicano de *Drosophila* evidenció una región rica en O-manosa, que correspondía probablemente al dominio de tipo mucina, y que no era accesible al análisis mediante espectrometría de masas debido a su resistencia a la digestión con tripsina (Nakamura et al., 2010b).

En cambio, se ha conseguido un grado más alto de cobertura de secuencia para la parte C-terminal de la región de tipo mucina donde se han identificado 4 péptidos, así como para el propio dominio C-terminal del α -DG donde se han identificado 9 péptidos.

Los 4 péptidos de la parte C-terminal del dominio de tipo mucina (p450-459, p460-468, p469-477, p478-487) contenían 11 sitios potenciales de O-glicosilación y presentaban una alta heterogeneidad de las estructuras “core” de los glicanos **HexNAc-O-Ser/Thr** presentes sobre estas secuencias. Aunque los espectros de fragmentación no ofrecen información sobre los isómeros y las configuraciones anoméricas de los monosacáridos, muchos de los glicanos identificados en estas regiones corresponden probablemente a estructuras “core” 1, mono o disialiladas, de tipo: NeuAc α 3Gal β 3GalNAc α 1-O-Ser/Thr o NeuAc α 3Gal β 3(NeuAc α 6)GalNAc α 1-O-Ser/Thr. Así mismo, los glicanos de tipo HexNAc-**HexNAc-O-Ser/Thr** podrían ser cualquiera de los O glicanos “core” 3 (GlcNAc β 3GlcNAc α 1-O-Ser/Thr), “core” 5 (GalNAc α 3GalNAc α 1-O-Ser/Thr), “core” 6 (GlcNAc β 6GalNAc α 1-O-Ser/Thr) o “core” 7 (GalNAc α 6GalNAc α 1-O-Ser/Thr). La heterogeneidad de las posibles estructuras “core” y de sus sitios de ocupación correspondientes en la región p450-487 sugiere la existencia de un perfil muy complejo de glicosilación para las estructuras “core” **HexNAc-O-Ser/Thr**. Puesto que la glicosilación del α -DG es fundamental para la unión a ligandos extracelulares, es lógico pensar que la biosíntesis de los glicanos implicados en esta unión podría estar estrictamente controlada. Esto indica que la región p450-487 del α -DG de ratón, debido a su gran heterogeneidad de O-glicanos de tipo mucina, podría no estar implicada en la actividad de unión a ligandos. Esta hipótesis está reforzada por los estudios anteriores acerca de los perfiles de glicosilación del α -DG de músculo esquelético humano y el α -DG recombinante de ratón (Nilsson et al., 2010, Harrison et al., 2012), donde se ha observado una alta heterogeneidad de los O-glicanos **HexNAc-O-Ser/Thr** que se encuentran situados en la parte C-terminal del dominio de tipo mucina.

Las estructuras NeuAc-Hex-HexNAc-**Hex**-O-Ser/Thr identificadas para el glicopéptido p358-369 son compatibles y probablemente idénticas a las estructuras LacNAc-Man (NeuAc α 3Gal β 4GlcNAc β 2Man-O-Ser/Thr) publicadas previamente, lo que indica la presencia de O-manosilación en esta región del α -DG. Interesantemente, otros dos estudios recientes confirmaron nuestros resultados, ya que las estructuras NeuAc-Hex-HexNAc-**Hex**-O-Ser/Thr se encontraron sobre el péptido p358-369 del α -DG nativo de músculo esquelético humano y α -DG recombinante de ratón (Nilsson et al., 2010, Harrison et al., 2012). Las estructuras LacNAc-Man corresponden a los primeros O-glicanos descritos como participantes en la unión del α -DG a la laminina y a otros ligandos (Chiba et al., 1997). Por el contrario, en el α -DG purificado a partir de músculo esquelético de conejo se han detectado O-glicanos de tipo mucina (**HexNAc**-O-Ser/Thr) unidos a los sitios potenciales de glicosilación pertenecientes al péptido p358-369, mientras que los O-manosilglicanos (**Hex**-O-Ser/Thr) se han encontrado presentes en la parte C-terminal del dominio de tipo mucina, concretamente sobre los péptidos p469-477 y p480-486 (Stalnaker et al., 2010). Según los autores, las discrepancias existentes entre los patrones de glicosilación del α -DG humano y de conejo podrían deberse a una variación especie específica. Sin embargo, nuestros datos junto con los datos ofrecidos por la Dra. Grahn, que realizó la caracterización glicoproteómica del α -DG nativo procedente de otras biopsias de músculo esquelético humano y de conejo, refutan la presencia de un perfil de O-manosilación especie específico y sugieren una estricta distribución de los dos tipos de O-glicosilación a lo largo del dominio de tipo mucina del α -DG, ya que los O-manosilglicanos (**Hex**-O-Ser/Thr) se han detectado en la región N-terminal y los glicanos de tipo mucina (**HexNAc**-O-Ser/Thr) se han detectado en la región C-terminal (manuscrito en preparación). Todos estos datos validan nuestro sistema celular como un modelo adecuado para el estudio de la glicosilación del α -DG.

En cuanto a la variabilidad de los O-manosilglicanos presentes sobre el péptido p358-369, hemos observado una alta heterogeneidad de las estructuras O-manosiladas presentes en esta región, ya que, además de las estructuras sialiladas (NeuAc-Hex-HexNAc-**Hex**-O-Ser/Thr), se han detectado estructuras Hex-HexNAc-**Hex**-O-Ser/Thr que presentaban NeuGc como residuo terminal y también estructuras O-manosiladas asociadas con los epítomos B, H y Galili. Un grado similar de heterogeneidad de las estructuras O-manosiladas se ha descrito para el α -DG recombinante de ratón y el

α -DG nativo de músculo de conejo. Sin embargo Nilsson *et al.* (2010) ha reportado una variabilidad estructural limitada para los O-manosilglicanos sugiriendo una regulación estricta y específica de la O-manosilación. Se ha postulado que la O-manosilación regula la síntesis de los O-glicanos O-GalNAc presentes en el dominio de tipo mucina del α -DG debido a que las enzimas que catalizan la adición de residuos de O-manosa están localizadas en el retículo endoplásmico y preceden a la maquinaria implicada en la adición de O-GalNAc localizada en el aparato de Golgi (Breloy et al., 2008). La O-manosilación del α -DG está controlada por regiones peptídicas localizadas delante y dentro del dominio de tipo mucina. Se ha descrito que el péptido p377-417 es necesario y suficiente para inducir la O-manosilación.

En este trabajo se han identificados glicopéptidos correspondientes a un fragmento peptídico (p358-369) localizado delante de la región anteriormente mencionada, indicando que la O-manosilación puede tener lugar tanto delante como detrás de este potencial elemento regulador. A pesar de la estricta delimitación entre los sitios potenciales de glicosilación de tipo **Hex-O-Ser/Thr** y **HexNAc-O-Ser/Thr**, observada para el α -DG nativo de ratón, en el caso de los péptidos p469-477 y p478-487 se han identificado sitios de O-glicosilación que podrían estar modificados mediante adición tanto de O-Man como de O-GalNAc. Resultados similares se han obtenido en el caso del péptido p471-479 del α -DG nativo de músculo de conejo sugiriendo, un intercambio entre las dos vías biosintéticas (Stalnaker et al., 2010).

En este trabajo, al igual que en otros estudios previos, se ha realizado la purificación del α -DG mediante el uso de lectinas seguido por inmunoprecipitación con el anticuerpo VIA4-1, ya que no es posible purificar la proteína directamente del extracto proteico total mediante inmunoprecipitación. El uso los distintos tipos de lectinas permite el enriquecimiento de aquellos glicanos que presentan afinidad para la lectina utilizada, y que representan sólo una fracción del número total de glicanos presentes *in vivo*. Por ejemplo, la purificación del α -DG utilizando la lectina VVA (*Vicia villosa agglutinin*) ha permitido la identificación de tres glicoformas distintas, indicando la existencia de otras estructuras con composición desconocida (McDearmon et al., 2001).

Por otro lado, la purificación mediante el uso de la lectina WFA (*Wisteria floribunda agglutinin*) del α -DG recombinante de conejo, expresado de células HEK293T y su posterior caracterización, ha revelado la presencia de un nuevo

O-manosilglicano fosforilado de tipo GalNAc β 1,3GlcNAc β 1,4(C6-Fosfato)**Man-O-Ser/Thr**, unido a la Thr379 (péptido p374-389) (Yoshida-Moriguchi et al., 2010). El mismo trisacárido fosforilado se ha identificado también, de manera indirecta, en el α -DG recombinante de ratón expresado en células HEK293T (Harrison et al., 2012).

En este trabajo, al igual que en el caso del α -DG nativo procedente de músculo esquelético humano o de conejo, no se ha podido confirmar la fosforilación o la presencia de la estructura GalNAc β 1,3GlcNAc β 1,4**Man-O-Ser/Thr**. A pesar de la atención especial que se ha tenido en la búsqueda del péptido p374-389 que contiene el sitio potencial de O-manosilfosforilación, no se ha podido identificar dicho péptido en ninguno de los análisis glicoproteómicos del α -DG nativo procedente tanto de biopsias musculares (humanas y de conejo) (Nilsson et al., 2010, Stalnaker et al., 2010) como de línea celular de mioblastos de ratón C2C12. Teniendo en cuenta que en los dos trabajos en los que se describió la O-manosilfosforilación del α -DG se ha utilizado proteína recombinante expresada en células HEK293T, postulamos que este tipo de modificación postraducciona l podría deberse a la expresión de proteínas recombinantes en sistemas celulares heterólogos.

6. Estudio de la función de FKTN

La purificación del α -DG de la línea de fibroblastos de piel procedentes de un paciente con sintomatología característica de WWS evidenció una correcta glicosilación de esta proteína a pesar de la presencia de dos mutaciones sin sentido en el gen *FKTN*.

La patogenicidad de la mutación p.Ile129X es evidente, ya que genera la pérdida de las $\frac{3}{4}$ partes finales (332 aminoácidos) de la proteína que incluye el dominio LicD, probablemente importante para la función de esta proteína (Figura 45).

Sin embargo, la mutación p.Tyr392X genera la eliminación de los últimos 69 aminoácidos. Es posible que esta mutación no elimine por completo la función de la proteína a pesar de estar localizada en una región conservada, ya aún mantendría el dominio funcional predicho LicD.

Además, en tejidos como la piel, los defectos en FKTN podrían no afectar al estado de glicosilación del α -DG. Esta hipótesis se apoya en un trabajo reciente en el cual se ha demostrado, mediante el uso de animales modelo para el estudio de las distroglicanopatías, que la glicosilación del α -DG no se ve afectada por defectos en FKTN, FKRP y LARGE en órganos como testículo y pulmón (Kuga et al., 2012). En el

caso del α -DG, su interacción con los ligandos está condicionada por los O-glicanos, cuya composición es específica de cada órgano y está estrictamente regulada durante el desarrollo. La existencia de diferencias estructurales entre los O-glicanos del α -DG procedente de distintos tejidos podría explicar la falta de alteraciones en otros órganos diferentes del músculo y el cerebro en los pacientes con distroglicanopatía. Sin embargo, se desconoce todavía si FKTN podría estar implicada en la glicosilación del α -DG en estos órganos. Se necesitan más estudios acerca de la expresión de la FKTN tanto en órganos no musculares como en líneas celulares derivadas de ellos para analizar su implicación en la ruta de glicosilación del α -DG.



Figura 45. Representación esquemática de la FKTN. Se muestra el dominio transmembrana (TM) y el dominio LicD que contiene el motivo DxD. Las dos mutaciones presentes en el paciente WWS están indicadas.

Conclusiones

1. Este trabajo confirma la ampliación del espectro fenotípico asociado a alteraciones en el gen *POMGNT1*, ya que se han caracterizado dos pacientes con características clínicas muy distintas (un paciente con distroglicanopatía grave MEB, y otro sólo con distrofia muscular de cinturas LGMD2O) que presentaban fallos en la glicosilación del α -DG debido a alteraciones en el gen *POMGNT1*.
2. Se describe el segundo paciente con fenotipo LGMD2O conocido hasta la fecha con mutaciones en el gen *POMGNT1*, siendo la primera vez que se encuentra una mutación en la región promotora, no sólo de este gen sino incluso de cualquiera de los otros genes implicados en distroglicanopatías.
3. Esta mutación en la región promotora de *POMGNT1* implica una duplicación de 9 pb en homocigosis (-83_-75dup), la cual es responsable de una disminución de los niveles de ARNm y proteína debido a una represión transcripcional mediada por el factor ZNF202.
4. La transcripción del gen *POMGNT1* esta regulada entre otros por los factores de transcripción Sp1, Ets-1 y GATA. Sp1 se une *in vivo* al promotor *POMGNT1* en células COS7 y posee al menos tres sitios funcionales localizados en las posiciones -318/-310, +13/+19 y +28/+34.
5. Nuestros datos ponen de manifiesto la importancia de realizar la caracterización funcional de los promotores en aquellos pacientes con distroglicanopatía en los cuales no se han detectado mutaciones en la región codificante del gen. Las mutaciones localizadas dentro de elementos reguladores o que puedan afectar a sitios de unión de factores de transcripción pueden alterar la actividad transcripcional normal de los genes implicados en la ruta de glicosilación del α -DG, dando lugar a la formación de un α -DG hipoglicosilado.
6. Describimos un caso grave de MEB causado por mutaciones en el gen *POMGNT1*, con graves alteraciones cerebrales y oculares, pero sin un patrón distrófico claro en la biopsia muscular. Los datos clínicos de este paciente permiten la ampliación del espectro fenotípico de MEB hasta incluir hipotonía pronunciada, graves

malformaciones cerebrales y oculares, pero con un patrón distrófico muy leve a pesar de la ausencia de glicosilación del α -DG.

7. Describimos la purificación y la caracterización mediante espectrometría de masas de los O-glicanos presentes en la región de tipo mucina del α -DG nativo procedente de miotubos de ratón C2C12. Las uniones Hex-*O*-Ser/Thr se han detectado casi exclusivamente sobre el glicopéptido p358-369, lo que indica la prevalencia de O-manosilación en la región N-terminal del dominio de tipo mucina. Las estructuras mayoritarias identificadas en esta región p358-369 son de tipo Hex-HexNAc-Hex-*O*-Ser/Thr y presentan como azúcares terminales tanto NeuAc, dando lugar a estructuras compatibles con el tetrasacárido NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-*O*-Ser/Thr, como NeuGc, **Fuc o Hex**.

8. Los glicopéptidos p450-459, p460-468, p469-477 y p478-487, adyacentes uno al otro en la secuencia proteica y situados en la región C-terminal del dominio tipo mucina, presentan una alta heterogeneidad de las estructuras “core” de tipo HexNAc-*O*-Ser/Thr. El enlace HexNAc-*O*-Ser/Thr se encuentra elongado con residuos de Hex o HexNAc, y muchos de los glicanos Hex-HexNAc-*O*-Ser/Thr presentan un residuo de ácido siálico (NeuAc) como residuo terminal de la cadena.

9. Para el estudio del papel que desempeña FKTN en la glicosilación del α -DG no ha sido posible obtener, mediante silenciamiento con ARN de interferencia, un sistema celular C2C12 carente de FKTN que nos permitiese obtener un α -DG hipoglicosilado y que posteriormente fuese sometido a análisis glicoproteómico mediante espectrometría de masas. Consideramos que para inhibir la síntesis de O-glicanos del α -DG mediada por la ausencia de FKTN se necesitaría una interferencia de este gen superior al 90%. Por lo tanto, proponemos la generación de una línea celular C2C12 nula (KO) para *FKTN* empleando las nucleasas TAL.

Bibliografía

- AGRAWAL, S., ANDERSON, P., DURBEEJ, M., VAN ROOIJEN, N., IVARS, F., OPDENAKKER, G. & SOROKIN, L. M. 2006. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 203, 1007-19.
- AKASAKA-MANYA, K., MANYA, H., HAYASHI, M. & ENDO, T. 2011. Different roles of the two components of human protein O-mannosyltransferase, POMT1 and POMT2. *Biochem Biophys Res Commun*, 411, 721-5.
- AKASAKA-MANYA, K., MANYA, H., KOBAYASHI, K., TODA, T. & ENDO, T. 2004. Structure-function analysis of human protein O-linked mannanose beta1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1, POMGnT1. *Biochem Biophys Res Commun*, 320, 39-44.
- AKASAKA-MANYA, K., MANYA, H., NAKAJIMA, A., KAWAKITA, M. & ENDO, T. 2006. Physical and functional association of human protein O-mannosyltransferases 1 and 2. *J Biol Chem*, 281, 19339-45.
- ALLIKIAN, M. J. & MCNALLY, E. M. 2007. Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. *Traffic*, 8, 177-83.
- APWEILER, R., HERMJAKOB, H. & SHARON, N. 1999. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*, 1473, 4-8.
- ARAVIND, L. & KOONIN, E. V. 1999. The fukutin protein family--predicted enzymes modifying cell-surface molecules. *Curr Biol*, 9, R836-7.
- BALCI, B., UYANIK, G., DINCER, P., GROSS, C., WILLER, T., TALIM, B., HALILOGLU, G., KALE, G., HEHR, U., WINKLER, J. & TOPALOGLU, H. 2005. An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker-Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene. *Neuromuscul Disord*, 15, 271-5.
- BARRESI, R. & CAMPBELL, K. P. 2006. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci*, 119, 199-207.
- BELTRAN-VALERO DE BERNABE, D., CURRIER, S., STEINBRECHER, A., CELLI, J., VAN BEUSEKOM, E., VAN DER ZWAAG, B., KAYSERILI, H., MERLINI, L., CHITAYAT, D., DOBYNS, W. B., CORMAND, B., LEHESJOKI, A. E., CRUCES, J., VOIT, T., WALSH, C. A., VAN BOKHOVEN, H. & BRUNNER, H. G. 2002. Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet*, 71, 1033-43.
- BELTRAN-VALERO DE BERNABE, D., VOIT, T., LONGMAN, C., STEINBRECHER, A., STRAUB, V., YUVA, Y., HERRMANN, R., SPERNER, J., KORENKE, C., DIESEN, C., DOBYNS, W. B., BRUNNER, H. G., VAN BOKHOVEN, H., BROCKINGTON, M. & MUNTONI, F. 2004. Mutations in the FKR1 gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet*, 41, e61.
- BIANCHERI, R., BERTINI, E., FALACE, A., PEDEMONTE, M., ROSSI, A., D'AMICO, A., SCAPOLAN, S., BERGAMINO, L., PETRINI, S., CASSANDRINI, D., BRODA, P., MANFREDI, M., ZARA, F., SANTORELLI, F. M., MINETTI, C. & BRUNO, C. 2006. POMGnT1 mutations in congenital muscular dystrophy: genotype-phenotype correlation and expanded clinical spectrum. *Arch Neurol*, 63, 1491-5.
- BIANCHERI, R., FALACE, A., TESSA, A., PEDEMONTE, M., SCAPOLAN, S., CASSANDRINI, D., AIELLO, C., ROSSI, A., BRODA, P., ZARA, F., SANTORELLI,

- F. M., MINETTI, C. & BRUNO, C. 2007. POMT2 gene mutation in limb-girdle muscular dystrophy with inflammatory changes. *Biochem Biophys Res Commun*, 363, 1033-7.
- BOWE, M. A., DEYST, K. A., LESZYK, J. D. & FALLON, J. R. 1994. Identification and purification of an agrin receptor from Torpedo postsynaptic membranes: a heteromeric complex related to the dystroglycans. *Neuron*, 12, 1173-80.
- BOZZI, M., MORLACCHI, S., BIGOTTI, M. G., SCIANDRA, F. & BRANCACCIO, A. 2009. Functional diversity of dystroglycan. *Matrix Biol*, 28, 179-87.
- BRANCACCIO, A., SCHULTHESS, T., GESEMANN, M. & ENGEL, J. 1995. Electron microscopic evidence for a mucin-like region in chick muscle alpha-dystroglycan. *FEBS Lett*, 368, 139-42.
- BRANDEIS, M., FRANK, D., KESHET, I., SIEGFRIED, Z., MENDELSON, M., NEMES, A., TEMPER, V., RAZIN, A. & CEDAR, H. 1994. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature*, 371, 435-8.
- BRELOY, I., SCHWIENKE, T., GRIES, B., RAZAWI, H., MACHT, M., ALBERS, C. & HANISCH, F. G. 2008. Initiation of mammalian O-mannosylation in vivo is independent of a consensus sequence and controlled by peptide regions within and upstream of the alpha-dystroglycan mucin domain. *J Biol Chem*, 283, 18832-40.
- BROCKHAUSEN, I. 1999. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1473, 67-95.
- BROCKINGTON, M., BLAKE, D. J., PRANDINI, P., BROWN, S. C., TORELLI, S., BENSON, M. A., PONTING, C. P., ESTOURNET, B., ROMERO, N. B., MERCURI, E., VOIT, T., SEWRY, C. A., GUICHENEY, P. & MUNTONI, F. 2001a. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet*, 69, 1198-209.
- BROCKINGTON, M., YUVA, Y., PRANDINI, P., BROWN, S. C., TORELLI, S., BENSON, M. A., HERRMANN, R., ANDERSON, L. V., BASHIR, R., BURGUNDER, J. M., FALLET, S., ROMERO, N., FARDEAU, M., STRAUB, V., STOREY, G., POLLITT, C., RICHARD, I., SEWRY, C. A., BUSHBY, K., VOIT, T., BLAKE, D. J. & MUNTONI, F. 2001b. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet*, 10, 2851-9.
- BROWN, S. C., TORELLI, S., BROCKINGTON, M., YUVA, Y., JIMENEZ, C., FENG, L., ANDERSON, L., UGO, I., KROGER, S., BUSHBY, K., VOIT, T., SEWRY, C. & MUNTONI, F. 2004. Abnormalities in alpha-dystroglycan expression in MDC1C and LGMD2I muscular dystrophies. *Am J Pathol*, 164, 727-37.
- BRUNK, B. P., GOLDHAMER, D. J. & EMERSON, C. P., JR. 1996. Regulated demethylation of the myoD distal enhancer during skeletal myogenesis. *Dev Biol*, 177, 490-503.
- CHAI, W., YUEN, C. T., KOGELBERG, H., CARRUTHERS, R. A., MARGOLIS, R. U., FEIZI, T. & LAWSON, A. M. 1999. High prevalence of 2-mono- and 2,6-disubstituted manol-terminating sequences among O-glycans released from brain glycopeptides by reductive alkaline hydrolysis. *Eur J Biochem*, 263, 879-88.
- CHARRON, F. & NEMER, M. 1999. GATA transcription factors and cardiac development. *Semin Cell Dev Biol*, 10, 85-91.

- CHIBA, A., MATSUMURA, K., YAMADA, H., INAZU, T., SHIMIZU, T., KUSUNOKI, S., KANAZAWA, I., KOBATA, A. & ENDO, T. 1997. Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve alpha-dystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of alpha-dystroglycan with laminin. *J Biol Chem*, 272, 2156-62.
- CLEMENT, E., MERCURI, E., GODFREY, C., SMITH, J., ROBB, S., KINALI, M., STRAUB, V., BUSHBY, K., MANZUR, A., TALIM, B., COWAN, F., QUINLIVAN, R., KLEIN, A., LONGMAN, C., MCWILLIAM, R., TOPALOGLU, H., MEIN, R., ABBS, S., NORTH, K., BARKOVICH, A. J., RUTHERFORD, M. & MUNTONI, F. 2008a. Brain involvement in muscular dystrophies with defective dystroglycan glycosylation. *Ann Neurol*, 64, 573-82.
- CLEMENT, E. M., GODFREY, C., TAN, J., BROCKINGTON, M., TORELLI, S., FENG, L., BROWN, S. C., JIMENEZ-MALLEBRERA, C., SEWRY, C. A., LONGMAN, C., MEIN, R., ABBS, S., VAJSAR, J., SCHACHTER, H. & MUNTONI, F. 2008b. Mild POMGnT1 mutations underlie a novel limb-girdle muscular dystrophy variant. *Arch Neurol*, 65, 137-41.
- CORMAND, B., AVELA, K., PIHKO, H., SANTAVUORI, P., TALIM, B., TOPALOGLU, H., DE LA CHAPELLE, A. & LEHESJOKI, A. E. 1999. Assignment of the muscle-eye-brain disease gene to 1p32-p34 by linkage analysis and homozygosity mapping. *Am J Hum Genet*, 64, 126-35.
- COTARELO, R. P., VALERO, M. C., PRADOS, B., PENA, A., RODRIGUEZ, L., FANO, O., MARCO, J. J., MARTINEZ-FRIAS, M. L. & CRUCES, J. 2008. Two new patients bearing mutations in the fukutin gene confirm the relevance of this gene in Walker-Warburg syndrome. *Clin Genet*, 73, 139-45.
- CZUWARA-LADYKOWSKA, J., SHIRASAKI, F., JACKERS, P., WATSON, D. K. & TROJANOWSKA, M. 2001. Fli-1 inhibits collagen type I production in dermal fibroblasts via an Sp1-dependent pathway. *J Biol Chem*, 276, 20839-48.
- D'AMICO, A., PETRINI, S., PARISI, F., TESSA, A., FRANCALANCI, P., GRUTTER, G., SANTORELLI, F. M. & BERTINI, E. 2008. Heart transplantation in a child with LGMD2I presenting as isolated dilated cardiomyopathy. *Neuromuscul Disord*, 18, 153-5.
- D'AMICO, A., TESSA, A., BRUNO, C., PETRINI, S., BIANCHERI, R., PANE, M., PEDEMONTE, M., RICCI, E., FALACE, A., ROSSI, A., MERCURI, E., SANTORELLI, F. M. & BERTINI, E. 2006. Expanding the clinical spectrum of POMT1 phenotype. *Neurology*, 66, 1564-7; discussion 1461.
- DE BERNABE, D. B., VAN BOKHOVEN, H., VAN BEUSEKOM, E., VAN DEN AKKER, W., KANT, S., DOBYNS, W. B., CORMAND, B., CURRIER, S., HAMEL, B., TALIM, B., TOPALOGLU, H. & BRUNNER, H. G. 2003. A homozygous nonsense mutation in the fukutin gene causes a Walker-Warburg syndrome phenotype. *J Med Genet*, 40, 845-8.
- DEMIR, E., GUCUYENER, K., AKTURK, A., TALIM, B., KONUS, O., DEL BO, R., GHEZZI, S. & COMI, G. P. 2009. An unusual presentation of muscle-eye-brain disease: severe eye abnormalities with mild muscle and brain involvement. *Neuromuscul Disord*, 19, 692-5.
- DEVISME, L., BOUCHET, C., GONZALES, M., ALANIO, E., BAZIN, A., BESSIERES, B., BIGI, N., BLANCHET, P., BONNEAU, D., BONNIERES, M., BUCOURT, M., CARLES, D., CLARISSE, B., DELAHAYE, S., FALLET-BIANCO, C., FIGARELLA-BRANGER, D., GAILLARD, D., GASSER, B., DELEZOIDE, A. L., GUIMIOT, F., JOUBERT, M., LAURENT, N., LAQUERRIERE, A., LIPRANDI, A., LOGET, P.,

- MARCORELLES, P., MARTINOVIC, J., MENEZ, F., PATRIER, S., PELLUARD, F., PEREZ, M. J., ROULEAU, C., TRIAU, S., ATTIE-BITACH, T., VUILLAUMIER-BARROT, S., SETA, N. & ENCHA-RAZAVI, F. 2012. Cobblestone lissencephaly: neuropathological subtypes and correlations with genes of dystroglycanopathies. *Brain*, 135, 469-82.
- DEYST, K. A., BOWE, M. A., LESZYK, J. D. & FALLON, J. R. 1995. The alpha-dystroglycan-beta-dystroglycan complex. Membrane organization and relationship to an agrin receptor. *J Biol Chem*, 270, 25956-9.
- DIESEN, C., SAARINEN, A., PIHKO, H., ROSENLEW, C., CORMAND, B., DOBYNS, W. B., DIEGUEZ, J., VALANNE, L., JOENSUU, T. & LEHESJOKI, A. E. 2004. POMGnT1 mutation and phenotypic spectrum in muscle-eye-brain disease. *J Med Genet*, 41, e115.
- DONALDSON, L. W., PETERSEN, J. M., GRAVES, B. J. & MCINTOSH, L. P. 1994. Secondary structure of the ETS domain places murine Ets-1 in the superfamily of winged helix-turn-helix DNA-binding proteins. *Biochemistry*, 33, 13509-16.
- DOVE, A. 2001. The bittersweet promise of glycobiology. *Nat Biotechnol*, 19, 913-7.
- DURBEEJ, M., HENRY, M. D., FERLETTA, M., CAMPBELL, K. P. & EKBLOM, P. 1998. Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem*, 46, 449-57.
- ECHENNE, B., ARTHUIS, M., BILLARD, C., CAMPOS-CASTELLO, J., CASTEL, Y., DULAC, O., FONTAN, D., GAUTHIER, A., KULAKOWSKI, S., DE MEURON, G. & ET AL. 1986. Congenital muscular dystrophy and cerebral CT scan anomalies. Results of a collaborative study of the Societe de Neurologie Infantile. *J Neurol Sci*, 75, 7-22.
- ERVASTI, J. M. & CAMPBELL, K. P. 1991. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, 66, 1121-31.
- ERVASTI, J. M. & CAMPBELL, K. P. 1993. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol*, 122, 809-23.
- ERVASTI, J. M., OHLENDIECK, K., KAHL, S. D., GAVER, M. G. & CAMPBELL, K. P. 1990. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature*, 345, 315-9.
- ESAPA, C. T., MCILHINNEY, R. A. & BLAKE, D. J. 2005. Fukutin-related protein mutations that cause congenital muscular dystrophy result in ER-retention of the mutant protein in cultured cells. *Hum Mol Genet*, 14, 295-305.
- FEDERICO, A., DOTTI, M. T., MALANDRINI, A., GUAZZI, G. C., HAYEK, G., SIMONATI, A., RIZZUTO, N. & TOTI, P. 1988. Cerebro-ocular dysplasia and muscular dystrophy: report of two cases. *Neuropediatrics*, 19, 109-12.
- FINNE, J., KRUSIUS, T., MARGOLIS, R. K. & MARGOLIS, R. U. 1979. Novel mannitol-containing oligosaccharides obtained by mild alkaline borohydride treatment of a chondroitin sulfate proteoglycan from brain. *J Biol Chem*, 254, 10295-300.
- GODFREY, C., CLEMENT, E., MEIN, R., BROCKINGTON, M., SMITH, J., TALIM, B., STRAUB, V., ROBB, S., QUINLIVAN, R., FENG, L., JIMENEZ-MALLEBRERA, C., MERCURI, E., MANZUR, A. Y., KINALI, M., TORELLI, S., BROWN, S. C., SEWRY, C. A., BUSHBY, K., TOPALOGLU, H., NORTH, K., ABBS, S. & MUNTONI, F. 2007. Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain*, 130, 2725-35.

- GODFREY, C., FOLEY, A. R., CLEMENT, E. & MUNTONI, F. 2011. Dystroglycanopathies: coming into focus. *Curr Opin Genet Dev*, 21, 278-85.
- HARA, Y., BALCI-HAYTA, B., YOSHIDA-MORIGUCHI, T., KANAGAWA, M., BELTRAN-VALERO DE BERNABE, D., GUNDESLI, H., WILLER, T., SATZ, J. S., CRAWFORD, R. W., BURDEN, S. J., KUNZ, S., OLDSTONE, M. B., ACCARDI, A., TALIM, B., MUNTONI, F., TOPALOGLU, H., DINCER, P. & CAMPBELL, K. P. 2011. A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy. *N Engl J Med*, 364, 939-46.
- HARRISON, R., HITCHEN, P. G., PANICO, M., MORRIS, H. R., MEKHEIL, D., PLEASS, R. J., DELL, A., HEWITT, J. E. & HASLAM, S. M. 2012. Glycoproteomic characterisation of recombinant mouse alpha-dystroglycan. *Glycobiology*.
- HAYASHI, Y. K., OGAWA, M., TAGAWA, K., NOGUCHI, S., ISHIHARA, T., NONAKA, I. & ARAHATA, K. 2001. Selective deficiency of alpha-dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Neurology*, 57, 115-21.
- HEHR, U., UYANIK, G., GROSS, C., WALTER, M. C., BOHRING, A., COHEN, M., OEHL-JASCHKOWITZ, B., BIRD, L. M., SHAMDEEN, G. M., BOGDAHN, U., SCHUIERER, G., TOPALOGLU, H., AIGNER, L., LOCHMULLER, H. & WINKLER, J. 2007. Novel POMGnT1 mutations define broader phenotypic spectrum of muscle-eye-brain disease. *Neurogenetics*, 8, 279-88.
- HERNANDEZ-TORRES, J., YUNTA, M. & LAZO, P. A. 2001. Differential cooperation between regulatory sequences required for human CD53 gene expression. *J Biol Chem*, 276, 35405-13.
- HESSE, C., JOHANSSON, I., MATTSSON, N., BREMELL, D., ANDREASSON, U., HALIM, A., ANCKARSATER, R., BLENNOW, K., ANCKARSATER, H., ZETTERBERG, H., LARSON, G., HAGBERG, L. & GRAHN, A. 2011. The N-terminal domain of alpha-dystroglycan, released as a 38 kDa protein, is increased in cerebrospinal fluid in patients with Lyme neuroborreliosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 412, 494-9.
- IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O., ERVASTI, J. M., LEVEILLE, C. J., SLAUGHTER, C. A., SERNETT, S. W. & CAMPBELL, K. P. 1992. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, 355, 696-702.
- IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O., MILATOVICH, A., OZCELIK, T., YANG, B., KOEPNICK, K., FRANCKE, U. & CAMPBELL, K. P. 1993. Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum Mol Genet*, 2, 1651-7.
- JAEKEN, J. 2003. Komrower Lecture. Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's all in it! *J Inherit Metab Dis*, 26, 99-118.
- JAYASINHA, V., NGUYEN, H. H., XIA, B., KAMMESHEIDT, A., HOYTE, K. & MARTIN, P. T. 2003. Inhibition of dystroglycan cleavage causes muscular dystrophy in transgenic mice. *Neuromuscul Disord*, 13, 365-75.
- JIMENEZ-MALLEBRERA, C., TORELLI, S., FENG, L., KIM, J., GODFREY, C., CLEMENT, E., MEIN, R., ABBS, S., BROWN, S. C., CAMPBELL, K. P., KROGER, S., TALIM, B., TOPALOGLU, H., QUINLIVAN, R., ROPER, H., CHILDS, A. M., KINALI, M., SEWRY, C. A. & MUNTONI, F. 2009. A comparative study of alpha-dystroglycan glycosylation in dystroglycanopathies suggests that the hypoglycosylation of alpha-dystroglycan does not consistently correlate with clinical severity. *Brain Pathol*, 19, 596-611.

- JING, J., LIEN, C. F., SHARMA, S., RICE, J., BRENNAN, P. A. & GORECKI, D. C. 2004. Aberrant expression, processing and degradation of dystroglycan in squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer*, 40, 2143-51.
- JOLLIFF, K., LI, Y. & JOHNSON, L. F. 1991. Multiple protein-DNA interactions in the TATAA-less mouse thymidylate synthase promoter. *Nucleic Acids Res*, 19, 2267-74.
- JOST, J. P. & JOST, Y. C. 1994. Transient DNA demethylation in differentiating mouse myoblasts correlates with higher activity of 5-methyldeoxycytidine excision repair. *J Biol Chem*, 269, 10040-3.
- KANAGAWA, M., SAITO, F., KUNZ, S., YOSHIDA-MORIGUCHI, T., BARRESI, R., KOBAYASHI, Y. M., MUSCHLER, J., DUMANSKI, J. P., MICHELE, D. E., OLDSTONE, M. B. & CAMPBELL, K. P. 2004. Molecular recognition by LARGE is essential for expression of functional dystroglycan. *Cell*, 117, 953-64.
- KERAMARIS-VRANTSIS, E., LU, P. J., DORAN, T., ZILLMER, A., ASHAR, J., ESAPA, C. T., BENSON, M. A., BLAKE, D. J., ROSENFELD, J. & LU, Q. L. 2007. Fukutin-related protein localizes to the Golgi apparatus and mutations lead to mislocalization in muscle in vivo. *Muscle Nerve*, 36, 455-65.
- KOBATA, A. 1992. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur J Biochem*, 209, 483-501.
- KONDO-IIDA, E., KOBAYASHI, K., WATANABE, M., SASAKI, J., KUMAGAI, T., KOIDE, H., SAITO, K., OSAWA, M., NAKAMURA, Y. & TODA, T. 1999. Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Mol Genet*, 8, 2303-9.
- KORINTHENBERG, R., PALM, D., SCHLAKE, W. & KLEIN, J. 1984. Congenital muscular dystrophy, brain malformation and ocular problems (muscle, eye and brain disease) in two German families. *Eur J Pediatr*, 142, 64-8.
- KUGA, A., KANAGAWA, M., SUDO, A., CHAN, Y. M., TAJIRI, M., MANYA, H., KIKKAWA, Y., NOMIZU, M., KOBAYASHI, K., ENDO, T., LU, Q. L., WADA, Y. & TODA, T. 2012. Absence of Post-phosphoryl Modification in Dystroglycanopathy Mouse Models and Wild-type Tissues Expressing Non-laminin Binding Form of alpha-Dystroglycan. *J Biol Chem*, 287, 9560-7.
- KUNZ, S., CALDER, L. & OLDSTONE, M. B. 2004. Electron microscopy of an alpha-dystroglycan fragment containing receptor sites for lymphocytic choriomeningitis virus and laminin, and use of the receptoid body as a reagent to neutralize virus. *Virology*, 325, 207-15.
- KURAHASHI, H., TANIGUCHI, M., MENO, C., TANIGUCHI, Y., TAKEDA, S., HORIE, M., OTANI, H. & TODA, T. 2005. Basement membrane fragility underlies embryonic lethality in fukutin-null mice. *Neurobiol Dis*, 19, 208-17.
- LABELLE-DUMAIS, C., DILWORTH, D. J., HARRINGTON, E. P., DE LEAU, M., LYONS, D., KABAEVA, Z., MANZINI, M. C., DOBYNS, W. B., WALSH, C. A., MICHELE, D. E. & GOULD, D. B. 2011. COL4A1 mutations cause ocular dysgenesis, neuronal localization defects, and myopathy in mice and Walker-Warburg syndrome in humans. *PLoS Genet*, 7, e1002062.
- LE, H. B., VAISANEN, P. A., JOHNSON, J. L., RANEY, A. K. & MCLACHLAN, A. 1994. Regulation of transcription from the human muscle phosphofructokinase P2 promoter by the Sp1 transcription factor. *DNA Cell Biol*, 13, 473-85.
- LEFEBER, D. J., BROUWER, A. P., MORAVA, E., RIEMERSMA, M., SCHUURS-HOEIJMAKERS, J. H., ABSMANNER, B., VERRIJP, K., AKKER, W. M., HUIJBEN, K., STEENBERGEN, G., REEUWIJK, J., JOZWIAK, A., ZUCKER, N., LORBER, A.,

- LAMMENS, M., KNOFF, C., BOKHOVEN, H., GRUNEWALD, S., LEHLE, L., KAPUSTA, L., MANDEL, H. & WEVERS, R. A. 2011. Autosomal recessive dilated cardiomyopathy due to DOLK mutations results from abnormal dystroglycan O-mannosylation. *PLoS Genet*, 7, e1002427.
- LEFEBER, D. J., SCHONBERGER, J., MORAVA, E., GUILLARD, M., HUYBEN, K. M., VERRIJP, K., GRAFAKOU, O., EVANGELIOU, A., PREIJERS, F. W., MANTA, P., YILDIZ, J., GRUNEWALD, S., SPILIOTI, M., VAN DEN ELZEN, C., KLEIN, D., HESS, D., ASHIDA, H., HOFSTEENGE, J., MAEDA, Y., VAN DEN HEUVEL, L., LAMMENS, M., LEHLE, L. & WEVERS, R. A. 2009. Deficiency of Dol-P-Man synthase subunit DPM3 bridges the congenital disorders of glycosylation with the dystroglycanopathies. *Am J Hum Genet*, 85, 76-86.
- LEYTEN, Q. H., GABREELS, F. J., RENIER, W. O., RENKAWEK, K., TER LAAK, H. J. & MULLAART, R. A. 1992. Congenital muscular dystrophy with eye and brain malformations in six Dutch patients. *Neuropediatrics*, 23, 316-20.
- LI, R., PEI, H. & WATSON, D. K. 2000. Regulation of Ets function by protein - protein interactions. *Oncogene*, 19, 6514-23.
- LISI, M. T. & COHN, R. D. 2007. Congenital muscular dystrophies: new aspects of an expanding group of disorders. *Biochim Biophys Acta*, 1772, 159-72.
- LIU, J., BALL, S. L., YANG, Y., MEI, P., ZHANG, L., SHI, H., KAMINSKI, H. J., LEMMON, V. P. & HU, H. 2006. A genetic model for muscle-eye-brain disease in mice lacking protein O-mannose 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase (POMGnT1). *Mech Dev*, 123, 228-40.
- MANYA, H., AKASAKA-MANYA, K., NAKAJIMA, A., KAWAKITA, M. & ENDO, T. 2010. Role of N-glycans in maintaining the activity of protein O-mannosyltransferases POMT1 and POMT2. *J Biochem*, 147, 337-44.
- MANYA, H., BOUCHET, C., YANAGISAWA, A., VUILLAUMIER-BARROT, S., QUIJANO-ROY, S., SUZUKI, Y., MAUGENRE, S., RICHARD, P., INAZU, T., MERLINI, L., ROMERO, N. B., LETURCQ, F., BEZIER, I., TOPALOGU, H., ESTOURNET, B., SETA, N., ENDO, T. & GUICHENEY, P. 2008. Protein O-mannosyltransferase activities in lymphoblasts from patients with alpha-dystroglycanopathies. *Neuromuscul Disord*, 18, 45-51.
- MANYA, H., CHIBA, A., YOSHIDA, A., WANG, X., CHIBA, Y., JIGAMI, Y., MARGOLIS, R. U. & ENDO, T. 2004. Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 500-5.
- MANZINI, M. C., GLEASON, D., CHANG, B. S., HILL, R. S., BARRY, B. J., PARTLOW, J. N., PODURI, A., CURRIER, S., GALVIN-PARTON, P., SHAPIRO, L. R., SCHMIDT, K., DAVIS, J. G., BASEL-VANAGAITE, L., SEIDAHMED, M. Z., SALIH, M. A., DOBYNS, W. B. & WALSH, C. A. 2008. Ethnically diverse causes of Walker-Warburg syndrome (WWS): FCMD mutations are a more common cause of WWS outside of the Middle East. *Hum Mutat*, 29, E231-41.
- MARTIN, P. T. 2006. Mechanisms of disease: congenital muscular dystrophies-glycosylation takes center stage. *Nat Clin Pract Neurol*, 2, 222-30.
- MATSUMURA, K., ARAI, K., ZHONG, D., SAITO, F., FUKUTA-OHI, H., MAEKAWA, R., YAMADA, H. & SHIMIZU, T. 2003. Disruption of dystroglycan axis by beta-dystroglycan processing in cardiomyopathic hamster muscle. *Neuromuscul Disord*, 13, 796-803.

- MCDEARMON, E. L., COMBS, A. C. & ERVASTI, J. M. 2001. Differential Vicia villosa agglutinin reactivity identifies three distinct dystroglycan complexes in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 276, 35078-86.
- MERCURI, E., MESSINA, S., BRUNO, C., MORA, M., PEGORARO, E., COMI, G. P., D'AMICO, A., AIELLO, C., BIANCHERI, R., BERARDINELLI, A., BOFFI, P., CASSANDRINI, D., LAVERDA, A., MOGGIO, M., MORANDI, L., MORONI, I., PANE, M., PEZZANI, R., PICCHIECCHIO, A., PINI, A., MINETTI, C., MONGINI, T., MOTTARELLI, E., RICCI, E., RUGGIERI, A., SAREDI, S., SCUDERI, C., TESSA, A., TOSCANO, A., TORTORELLA, G., TREVISAN, C. P., UGGETTI, C., VASCO, G., SANTORELLI, F. M. & BERTINI, E. 2009. Congenital muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan: a population study. *Neurology*, 72, 1802-9.
- MESSINA, S., TORTORELLA, G., CONCOLINO, D., SPANO, M., D'AMICO, A., BRUNO, C., SANTORELLI, F. M., MERCURI, E. & BERTINI, E. 2009. Congenital muscular dystrophy with defective alpha-dystroglycan, cerebellar hypoplasia, and epilepsy. *Neurology*, 73, 1599-601.
- MICHELE, D. E. & CAMPBELL, K. P. 2003. Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *J Biol Chem*, 278, 15457-60.
- MIYAGOE-SUZUKI, Y., MASUBUCHI, N., MIYAMOTO, K., WADA, M. R., YUASA, S., SAITO, F., MATSUMURA, K., KANESAKI, H., KUDO, A., MANYA, H., ENDO, T. & TAKEDA, S. 2009. Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts in vitro. *Mech Dev*, 126, 107-16.
- MONACO, C., HELMER CITTERICH, M., CAPRINI, E., VORECHOVSKY, I., RUSSO, G., CROCE, C. M., BARBANTI-BRODANO, G. & NEGRINI, M. 1998. Molecular cloning and characterization of ZNF202: a new gene at 11q23.3 encoding testis-specific zinc finger proteins. *Genomics*, 52, 358-62.
- MOORE, C. J. & WINDER, S. J. 2010. Dystroglycan versatility in cell adhesion: a tale of multiple motifs. *Cell Commun Signal*, 8, 3.
- MUNTONI, F., TORELLI, S. & BROCKINGTON, M. 2008. Muscular dystrophies due to glycosylation defects. *Neurotherapeutics*, 5, 627-32.
- NAKAMURA, N., LYALIN, D. & PANIN, V. M. 2010a. Protein O-mannosylation in animal development and physiology: from human disorders to Drosophila phenotypes. *Semin Cell Dev Biol*, 21, 622-30.
- NAKAMURA, N., STALNAKER, S. H., LYALIN, D., LAVROVA, O., WELLS, L. & PANIN, V. M. 2010b. Drosophila Dystroglycan is a target of O-mannosyltransferase activity of two protein O-mannosyltransferases, Rotated Abdomen and Twisted. *Glycobiology*, 20, 381-94.
- NIELSEN, A. L., ORTIZ, J. A., YOU, J., OULAD-ABDELGHANI, M., KHECHUMIAN, R., GANSMULLER, A., CHAMBON, P. & LOSSON, R. 1999. Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J*, 18, 6385-95.
- NILSSON, J., LARSON, G. & GRAHN, A. 2010. Characterization of site-specific O-glycan structures within the mucin-like domain of alpha-dystroglycan from human skeletal muscle. *Glycobiology*, 20, 1160-9.
- NORIO, R. 2003. Finnish Disease Heritage I: characteristics, causes, background. *Hum Genet*, 112, 441-56.

- OHLENDIECK, K. & CAMPBELL, K. P. 1991. Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. *J Cell Biol*, 115, 1685-94.
- OLIVEIRA, J., SOARES-SILVA, I., FOKKEMA, I., GONCALVES, A., CABRAL, A., DIOGO, L., GALAN, L., GUIMARAES, A., FINEZA, I., DEN DUNNEN, J. T. & SANTOS, R. 2008. Novel synonymous substitution in POMGNT1 promotes exon skipping in a patient with congenital muscular dystrophy. *J Hum Genet*, 53, 565-72.
- ORKIN, S. H. 1992. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood*, 80, 575-81.
- PENG, H. B., ALI, A. A., DAGGETT, D. F., RAUVALA, H., HASSELL, J. R. & SMALHEISER, N. R. 1998. The relationship between perlecan and dystroglycan and its implication in the formation of the neuromuscular junction. *Cell Adhes Commun*, 5, 475-89.
- PIHKO, H., LAPPI, M., RAITTA, C., SAINIO, K., VALANNE, L., SOMER, H. & SANTAVUORI, P. 1995. Ocular findings in muscle-eye-brain (MEB) disease: a follow-up study. *Brain Dev*, 17, 57-61.
- PORSCH-OZCURREMEZ, M., LANGMANN, T., HEIMERL, S., BORSUKOVA, H., KAMINSKI, W. E., DROBNIK, W., HONER, C., SCHUMACHER, C. & SCHMITZ, G. 2001. The zinc finger protein 202 (ZNF202) is a transcriptional repressor of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 gene expression and a modulator of cellular lipid efflux. *J. Biol. Chem.*, 276, 12427-33.
- RADUCU, M., BAETS, J., FANO, O., VAN COSTER, R. & CRUCES, J. 2012. Promoter alteration causes transcriptional repression of the POMGNT1 gene in limb-girdle muscular dystrophy type 20. *Eur J Hum Genet*.
- RAITTA, C., LAMMINEN, M., SANTAVUORI, P. & LEISTI, J. 1978. Ophthalmological findings in a new syndrome with muscle, eye and brain involvement. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, 56, 465-72.
- RETTINO, A., RAFANELLI, F., GENOVESE, G., GORACCI, M., CIFARELLI, R. A., CITTADINI, A. & SGAMBATO, A. 2009. Identification of Sp1 and GC-boxes as transcriptional regulators of mouse Dag1 gene promoter. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297, C1113-23.
- RYAN, R. F., SCHULTZ, D. C., AYYANATHAN, K., SINGH, P. B., FRIEDMAN, J. R., FREDERICKS, W. J. & RAUSCHER, F. J., 3RD 1999. KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*, 19, 4366-78.
- SAITO, F., SAITO-ARAI, Y., NAKAMURA, A., SHIMIZU, T. & MATSUMURA, K. 2008. Processing and secretion of the N-terminal domain of alpha-dystroglycan in cell culture media. *FEBS Lett*, 582, 439-44.
- SANTAVUORI, P., SOMER, H., SAINIO, K., RAPOLA, J., KRUUS, S., NIKITIN, T., KETONEN, L. & LEISTI, J. 1989. Muscle-eye-brain disease (MEB). *Brain Dev*, 11, 147-53.
- SASAKI, T., YAMADA, H., MATSUMURA, K., SHIMIZU, T., KOBATA, A. & ENDO, T. 1998. Detection of O-mannosyl glycans in rabbit skeletal muscle alpha-dystroglycan. *Biochim Biophys Acta*, 1425, 599-606.
- SATO, S., OMORI, Y., KATOH, K., KONDO, M., KANAGAWA, M., MIYATA, K., FUNABIKI, K., KOYASU, T., KAJIMURA, N., MIYOSHI, T., SAWAI, H., KOBAYASHI, K., TANI, A., TODA, T., USUKURA, J., TANO, Y., FUJIKADO, T. &

- FURUKAWA, T. 2008. Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat Neurosci*, 11, 923-31.
- SCHUTZER, S. E., LIU, T., NATELSON, B. H., ANGEL, T. E., SCHEPMOES, A. A., PURVINE, S. O., HIXSON, K. K., LIPTON, M. S., CAMP, D. G., COYLE, P. K., SMITH, R. D. & BERGQUIST, J. 2010. Establishing the proteome of normal human cerebrospinal fluid. *PLoS One*, 5, e10980.
- SENTANDREU, R. & NORTHCOLE, D. H. 1968. The structure of a glycopeptide isolated from the yeast cell wall. *Biochem J*, 109, 419-32.
- SHARROCKS, A. D. 2001. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 827-37.
- SILAN, F., YOSHIOKA, M., KOBAYASHI, K., SIMSEK, E., TUNC, M., ALPER, M., CAM, M., GUVEN, A., FUKUDA, Y., KINOSHITA, M., KOCABAY, K. & TODA, T. 2003. A new mutation of the fukutin gene in a non-Japanese patient. *Ann Neurol*, 53, 392-6.
- SINGH, J., ITAHANA, Y., KNIGHT-KRAJEWSKI, S., KANAGAWA, M., CAMPBELL, K. P., BISSELL, M. J. & MUSCHLER, J. 2004. Proteolytic enzymes and altered glycosylation modulate dystroglycan function in carcinoma cells. *Cancer Res*, 64, 6152-9.
- SMALE, S. T., SCHMIDT, M. C., BERK, A. J. & BALTIMORE, D. 1990. Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 4509-13.
- SMALHEISER, N. R., HASLAM, S. M., SUTTON-SMITH, M., MORRIS, H. R. & DELL, A. 1998. Structural analysis of sequences O-linked to mannose reveals a novel Lewis X structure in cranin (dystroglycan) purified from sheep brain. *J Biol Chem*, 273, 23698-703.
- SMALHEISER, N. R. & SCHWARTZ, N. B. 1987. Cranin: a laminin-binding protein of cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 6457-61.
- STALNAKER, S. H., AOKI, K., LIM, J. M., PORTERFIELD, M., LIU, M., SATZ, J. S., BUSKIRK, S., XIONG, Y., ZHANG, P., CAMPBELL, K. P., HU, H., LIVE, D., TIEMEYER, M. & WELLS, L. 2011. Glycomic analyses of mouse models of congenital muscular dystrophy. *J Biol Chem*, 286, 21180-90.
- STALNAKER, S. H., HASHMI, S., LIM, J. M., AOKI, K., PORTERFIELD, M., GUTIERREZ-SANCHEZ, G., WHEELER, J., ERVASTI, J. M., BERGMANN, C., TIEMEYER, M. & WELLS, L. 2010. Site mapping and characterization of O-glycan structures on alpha-dystroglycan isolated from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem*, 285, 24882-91.
- SUGITA, S., SAITO, F., TANG, J., SATZ, J., CAMPBELL, K. & SUDHOF, T. C. 2001. A stoichiometric complex of neurexins and dystroglycan in brain. *J Cell Biol*, 154, 435-45.
- SVEEN, M. L., SCHWARTZ, M. & VISSING, J. 2006. High prevalence and phenotype-genotype correlations of limb girdle muscular dystrophy type 2I in Denmark. *Ann Neurol*, 59, 808-15.
- TABAK, L. A. 1995. In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Annu Rev Physiol*, 57, 547-64.
- TAKAHASHI, S., SASAKI, T., MANYA, H., CHIBA, Y., YOSHIDA, A., MIZUNO, M., ISHIDA, H., ITO, F., INAZU, T., KOTANI, N., TAKASAKI, S., TAKEUCHI, M. & ENDO, T. 2001. A new beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase that may

- play a role in the biosynthesis of mammalian O-mannosyl glycans. *Glycobiology*, 11, 37-45.
- TANIGUCHI, K., KOBAYASHI, K., SAITO, K., YAMANOUCHI, H., OHNUMA, A., HAYASHI, Y. K., MANYA, H., JIN, D. K., LEE, M., PARANO, E., FALSAPERLA, R., PAVONE, P., VAN COSTER, R., TALIM, B., STEINBRECHER, A., STRAUB, V., NISHINO, I., TOPALOGLU, H., VOIT, T., ENDO, T. & TODA, T. 2003. Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet*, 12, 527-34.
- TANIGUCHI-IKEDA, M., KOBAYASHI, K., KANAGAWA, M., YU, C. C., MORI, K., ODA, T., KUGA, A., KURAHASHI, H., AKMAN, H. O., DIMAURO, S., KAJI, R., YOKOTA, T., TAKEDA, S. & TODA, T. 2011. Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature*, 478, 127-31.
- TEBER, S., SEZER, T., KAFALI, M., MANZINI, M. C., KONUK YUKSEL, B., TEKIN, M., FITOZ, S., WALSH, C. A. & DEDA, G. 2008. Severe muscle-eye-brain disease is associated with a homozygous mutation in the POMGnT1 gene. *Eur J Paediatr Neurol*, 12, 133-6.
- TODA, T., CHIYONOBU, T., XIONG, H., TACHIKAWA, M., KOBAYASHI, K., MANYA, H., TAKEDA, S., TANIGUCHI, M., KURAHASHI, H. & ENDO, T. 2005. Fukutin and alpha-dystroglycanopathies. *Acta Myol*, 24, 60-3.
- TODA, T. & KOBAYASHI, K. 1999. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: the first human disease to be caused by an ancient retrotransposal integration. *J Mol Med (Berl)*, 77, 816-23.
- TOPALOGLU, H., CILA, A., TASDEMIR, A. H. & SAATCI, I. 1995. Congenital muscular dystrophy with eye and brain involvement. The Turkish experience in two cases. *Brain Dev*, 17, 271-5.
- URRUTIA, R. 2003. KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol*, 4, 231.
- VAJSAR, J. & SCHACHTER, H. 2006. Walker-Warburg syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, 1, 29.
- VAN DER KNAAP, M. S., SMIT, L. M., BARTH, P. G., CATSMAN-BERREVOETS, C. E., BROUWER, O. F., BEGEER, J. H., DE COO, I. F. & VALK, J. 1997. Magnetic resonance imaging in classification of congenital muscular dystrophies with brain abnormalities. *Ann Neurol*, 42, 50-9.
- VAN KLINKEN, B. J., DEKKER, J., BULLER, H. A. & EINERHAND, A. W. 1995. Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion. *Am J Physiol*, 269, G613-27.
- VAN REEUWIJK, J., GREWAL, P. K., SALIH, M. A., BELTRAN-VALERO DE BERNABE, D., MCLAUGHLAN, J. M., MICHIELSE, C. B., HERRMANN, R., HEWITT, J. E., STEINBRECHER, A., SEIDAHMED, M. Z., SHAHEED, M. M., ABOMELHA, A., BRUNNER, H. G., VAN BOKHOVEN, H. & VOIT, T. 2007. Intragenic deletion in the LARGE gene causes Walker-Warburg syndrome. *Hum Genet*, 121, 685-90.
- VAN REEUWIJK, J., JANSSEN, M., VAN DEN ELZEN, C., BELTRAN-VALERO DE BERNABE, D., SABATELLI, P., MERLINI, L., BOON, M., SCHEFFER, H., BROCKINGTON, M., MUNTONI, F., HUYNEN, M. A., VERRIPS, A., WALSH, C. A., BARTH, P. G., BRUNNER, H. G. & VAN BOKHOVEN, H. 2005. POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet*, 42, 907-12.

- VOGLMEIR, J., KALOO, S., LAURENT, N., MELONI, M. M., BOHLMANN, L., WILSON, I. B. & FLITSCH, S. L. 2011. Biochemical correlation of activity of the alpha-dystroglycan-modifying glycosyltransferase POMGnT1 with mutations in muscle-eye-brain disease. *Biochem J*, 436, 447-55.
- VUILLAUMIER-BARROT, S., QUIJANO-ROY, S., BOUCHET-SERAPHIN, C., MAUGENRE, S., PEUDENIER, S., VAN DEN BERGH, P., MARCORELLES, P., AVILA-SMIRNOW, D., CHELBI, M., ROMERO, N. B., CARLIER, R. Y., ESTOURNET, B., GUICHENEY, P. & SETA, N. 2009. Four Caucasian patients with mutations in the fukutin gene and variable clinical phenotype. *Neuromuscul Disord*, 19, 182-8.
- WAGNER, S., HESS, M. A., ORMONDE-HANSON, P., MALANDRO, J., HU, H., CHEN, M., KEHRER, R., FRODSHAM, M., SCHUMACHER, C., BELUCH, M., HONER, C., SKOLNICK, M., BALLINGER, D. & BOWEN, B. R. 2000. A broad role for the zinc finger protein ZNF202 in human lipid metabolism. *J Biol Chem*, 275, 15685-90.
- WARBURG, M. 1978. Hydrocephaly, congenital retinal nonattachment, and congenital falciform fold. *Am J Ophthalmol*, 85, 88-94.
- WILLER, T., PRADOS, B., FALCON-PEREZ, J. M., RENNER-MULLER, I., PRZEMECK, G. K., LOMMEL, M., COLOMA, A., VALERO, M. C., DE ANGELIS, M. H., TANNER, W., WOLF, E., STRAHL, S. & CRUCES, J. 2004. Targeted disruption of the Walker-Warburg syndrome gene *Pomt1* in mouse results in embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 14126-31.
- WILLIAMSON, R. A., HENRY, M. D., DANIELS, K. J., HRSTKA, R. F., LEE, J. C., SUNADA, Y., IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O. & CAMPBELL, K. P. 1997. Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dag1*-null mice. *Hum Mol Genet*, 6, 831-41.
- XIONG, H., KOBAYASHI, K., TACHIKAWA, M., MANYA, H., TAKEDA, S., CHIYONOBU, T., FUJIKAKE, N., WANG, F., NISHIMOTO, A., MORRIS, G. E., NAGAI, Y., KANAGAWA, M., ENDO, T. & TODA, T. 2006. Molecular interaction between fukutin and POMGnT1 in the glycosylation pathway of alpha-dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun*, 350, 935-41.
- YAMADA, H., SAITO, F., FUKUTA-OHI, H., ZHONG, D., HASE, A., ARAI, K., OKUYAMA, A., MAEKAWA, R., SHIMIZU, T. & MATSUMURA, K. 2001. Processing of beta-dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Hum Mol Genet*, 10, 1563-9.
- YAMAMOTO, T., KAWAGUCHI, M., SAKAYORI, N., MURAMATSU, F., MORIKAWA, S., KATO, Y., SHIBATA, N. & KOBAYASHI, M. 2006. Intracellular binding of fukutin and alpha-dystroglycan: relation to glycosylation of alpha-dystroglycan. *Neurosci Res*, 56, 391-9.
- YOSHIDA, A., KOBAYASHI, K., MANYA, H., TANIGUCHI, K., KANO, H., MIZUNO, M., INAZU, T., MITSUHASHI, H., TAKAHASHI, S., TAKEUCHI, M., HERRMANN, R., STRAUB, V., TALIM, B., VOIT, T., TOPALOGLU, H., TODA, T. & ENDO, T. 2001. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell*, 1, 717-24.
- YOSHIDA-MORIGUCHI, T., YU, L., STALNAKER, S. H., DAVIS, S., KUNZ, S., MADSON, M., OLDSTONE, M. B., SCHACHTER, H., WELLS, L. & CAMPBELL, K. P. 2010. O-mannosyl phosphorylation of alpha-dystroglycan is required for laminin binding. *Science*, 327, 88-92.

- YUEN, C. T., CHAI, W., LOVELESS, R. W., LAWSON, A. M., MARGOLIS, R. U. & FEIZI, T. 1997. Brain contains HNK-1 immunoreactive O-glycans of the sulfoglucuronyl lactosamine series that terminate in 2-linked or 2,6-linked hexose (mannose). *J Biol Chem*, 272, 8924-31.
- ZHANG, W., VAJSAR, J., CAO, P., BRENINGSTALL, G., DIESEN, C., DOBYNS, W., HERRMANN, R., LEHESJOKI, A. E., STEINBRECHER, A., TALIM, B., TODA, T., TOPALOGLU, H., VOIT, T. & SCHACHTER, H. 2003. Enzymatic diagnostic test for Muscle-Eye-Brain type congenital muscular dystrophy using commercially available reagents. *Clin Biochem*, 36, 339-44.

Anexo 1

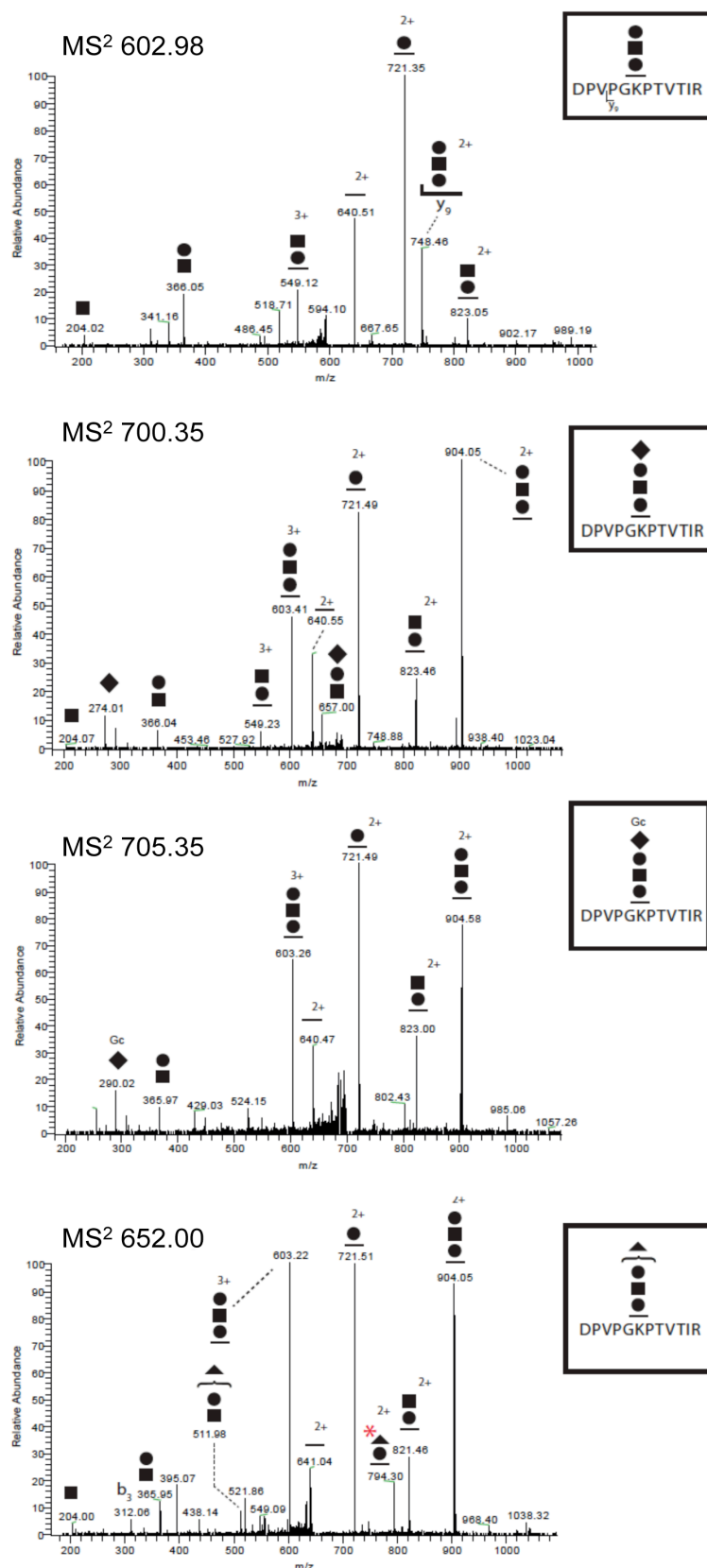


Figura 1. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” Hex-*O*-Thr presentes sobre el glicopéptido p358-369 (DPVPGKPTVTIR). Los O-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.

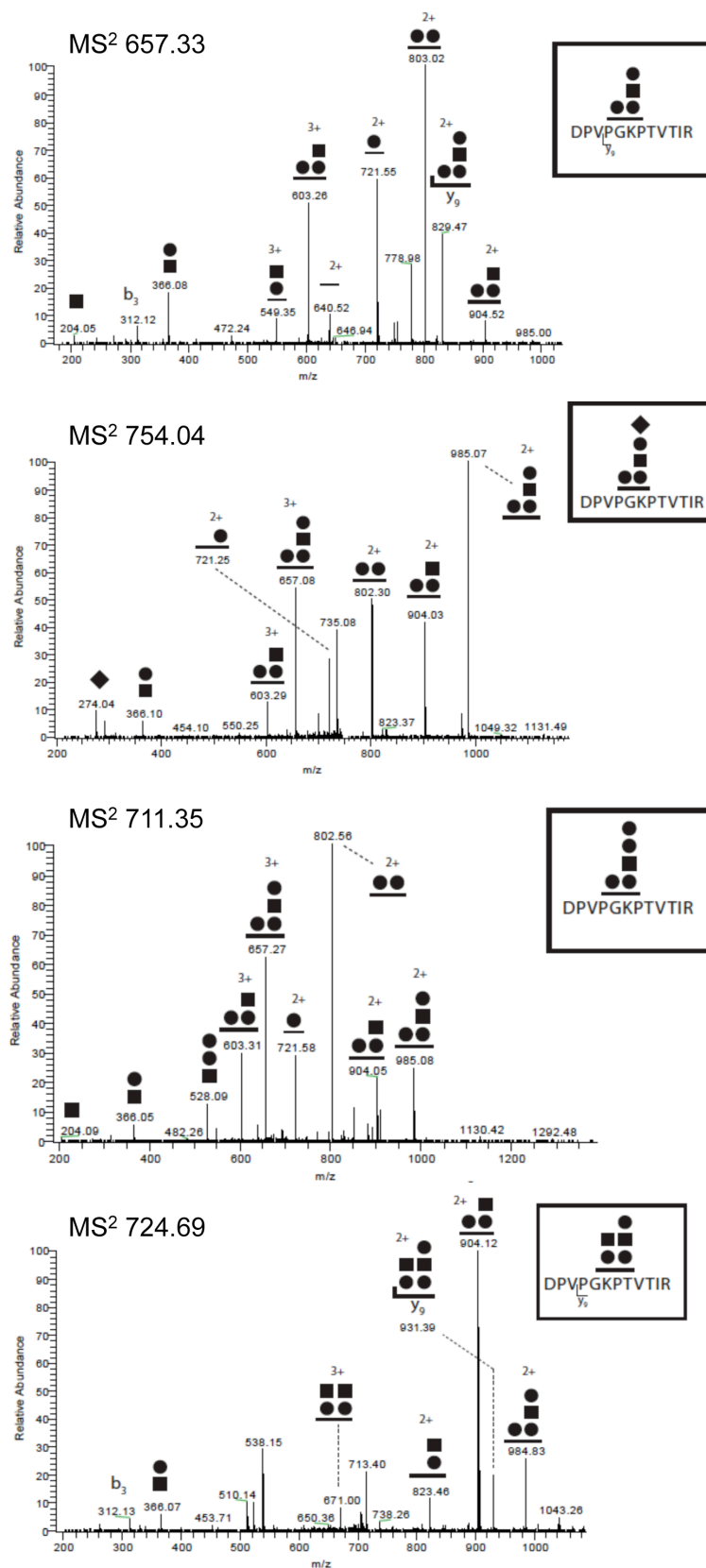


Figura 2. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” Hex-*O*-Thr presentes sobre el glicopéptido p358-369 (DPVPGKPTVTIR). Los O-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.

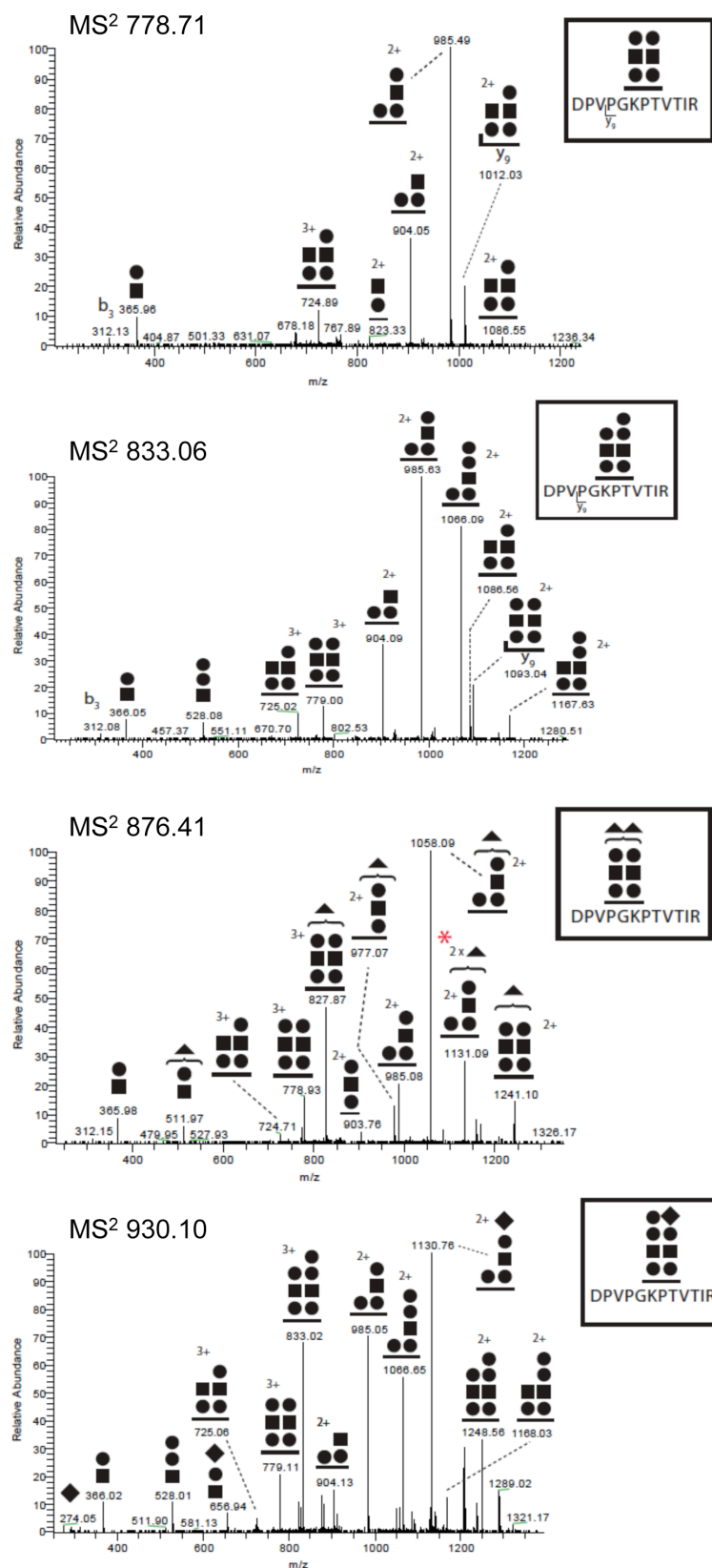


Figura 3. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” Hex-*O*-Thr presentes sobre el glicopéptido p358-369 (DPVPGKPTVTIR). Los O-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.

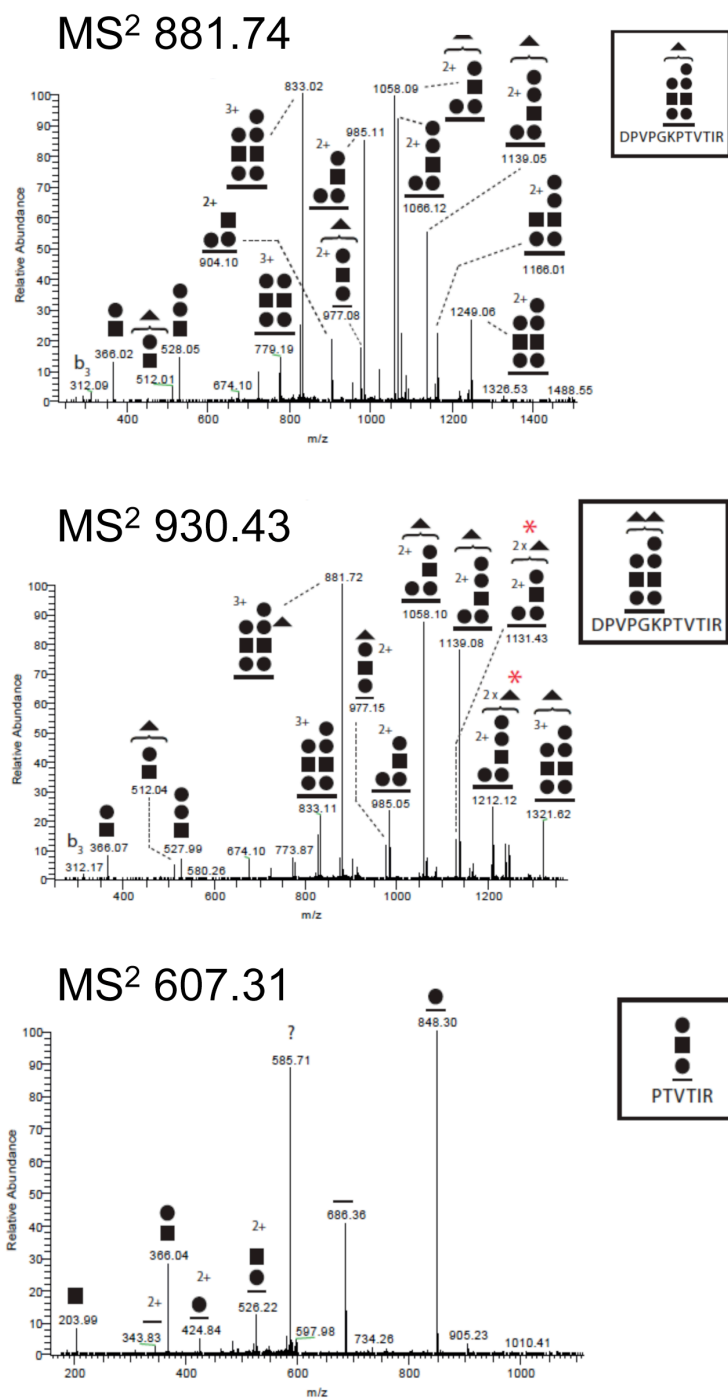


Figura 4. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” Hex-*O*-Thr presentes sobre el glicopéptido p358-369 (DPVPGKPTVTIR). Los O-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.

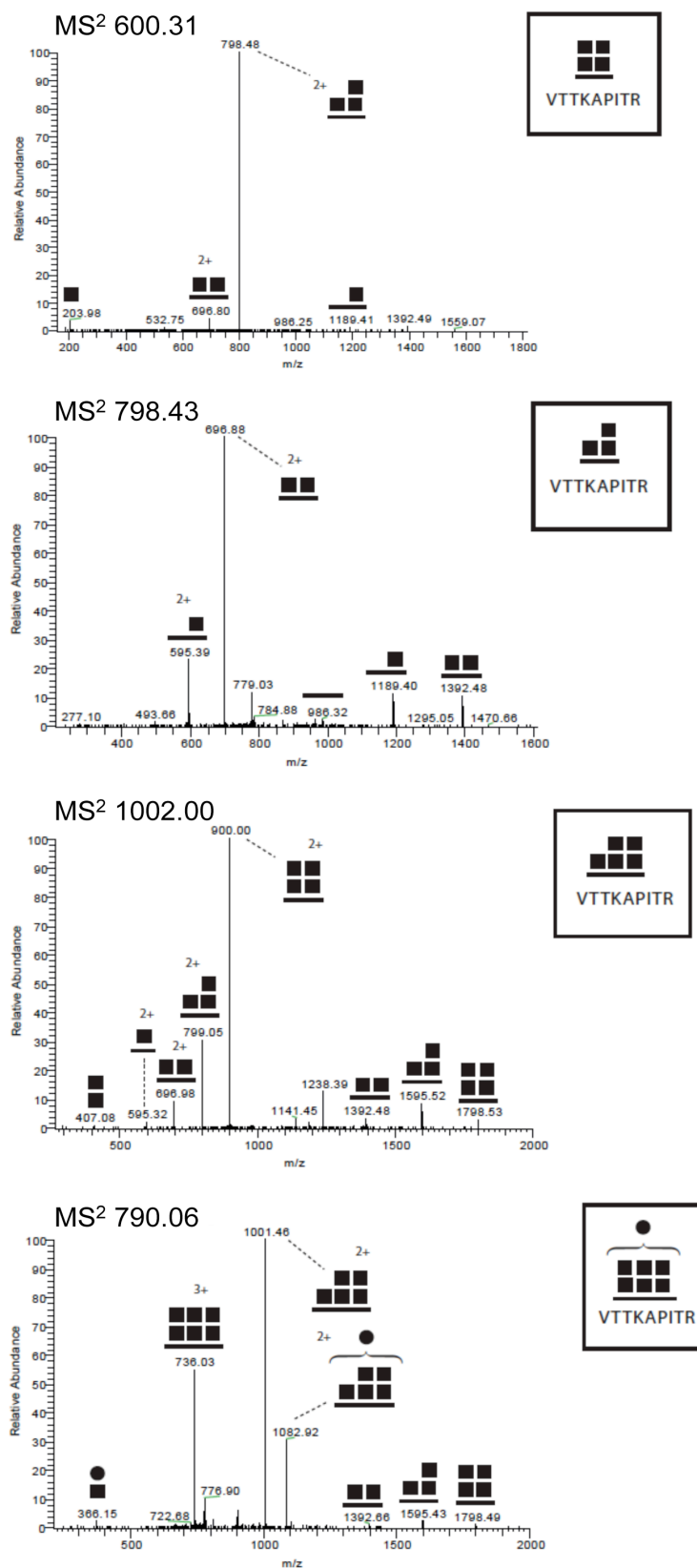


Figura 5. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” HexNAc-*O*-Thr presentes sobre el glicopéptido p460-468 (VTTKAPITR). Los *O*-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.

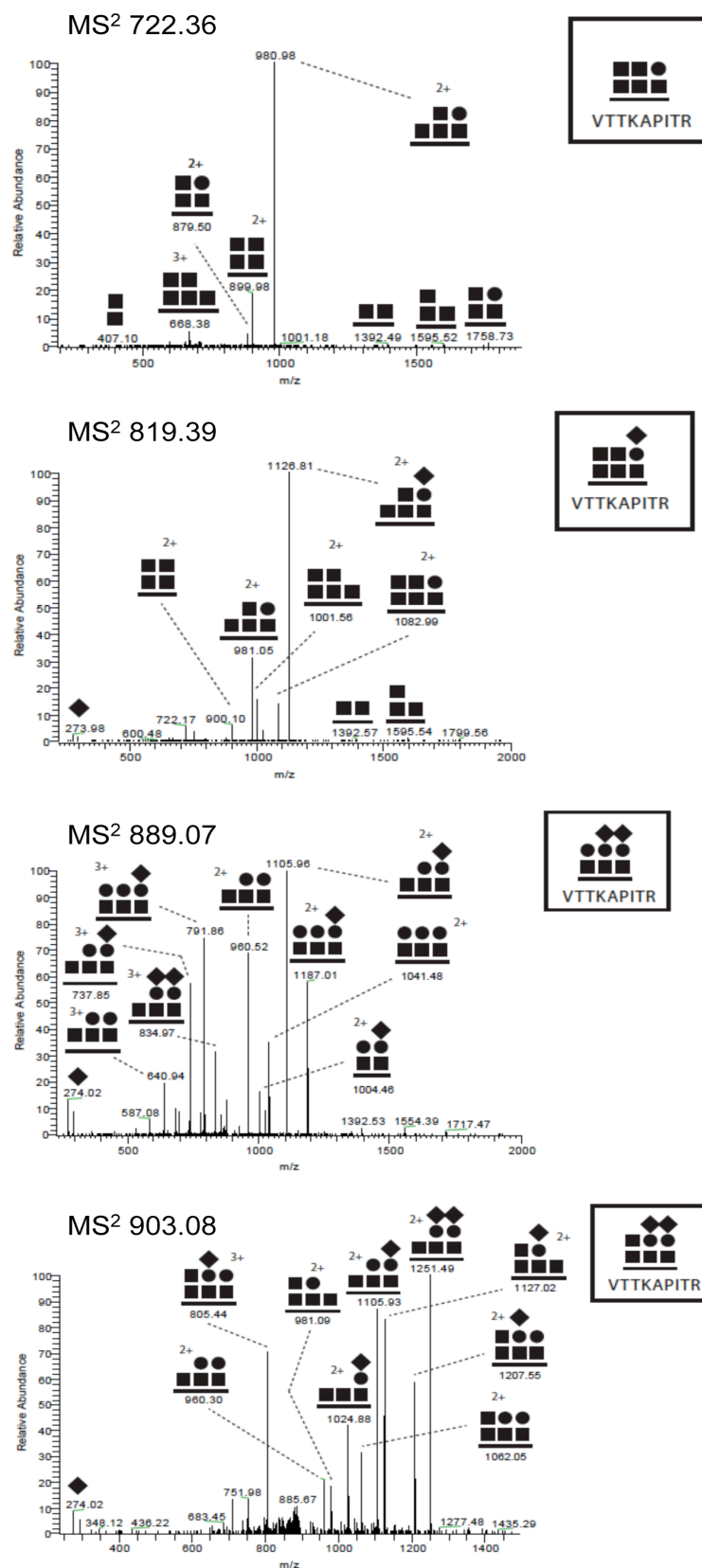


Figura 6. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” HexNAc-*O*-Thr presentes sobre el glicopéptido p460-468 (VTTKAPITR). Los O-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.

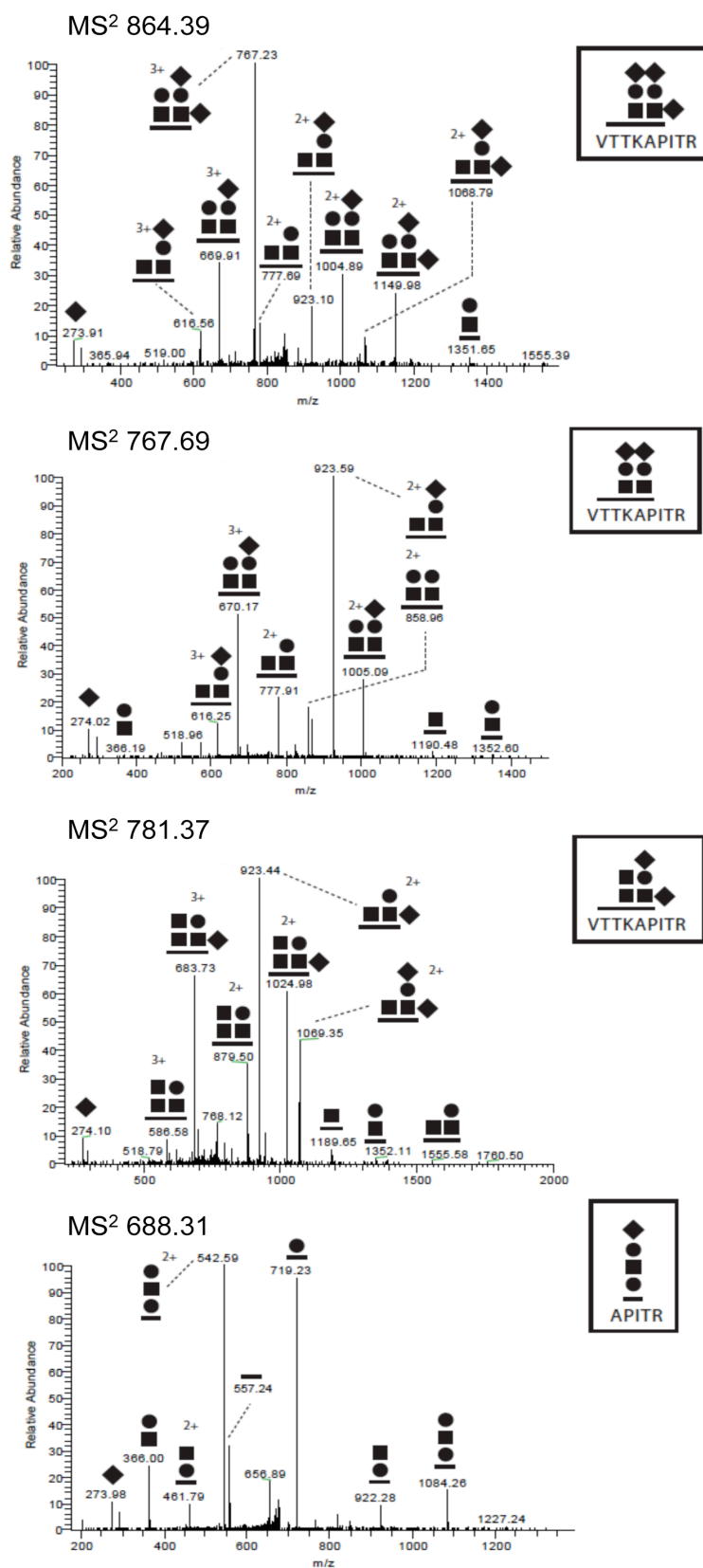


Figura 7. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” HexNAc-*O*-Thr presentes sobre el glicopéptido p460-468 (VTTKAPITR). Los O-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.

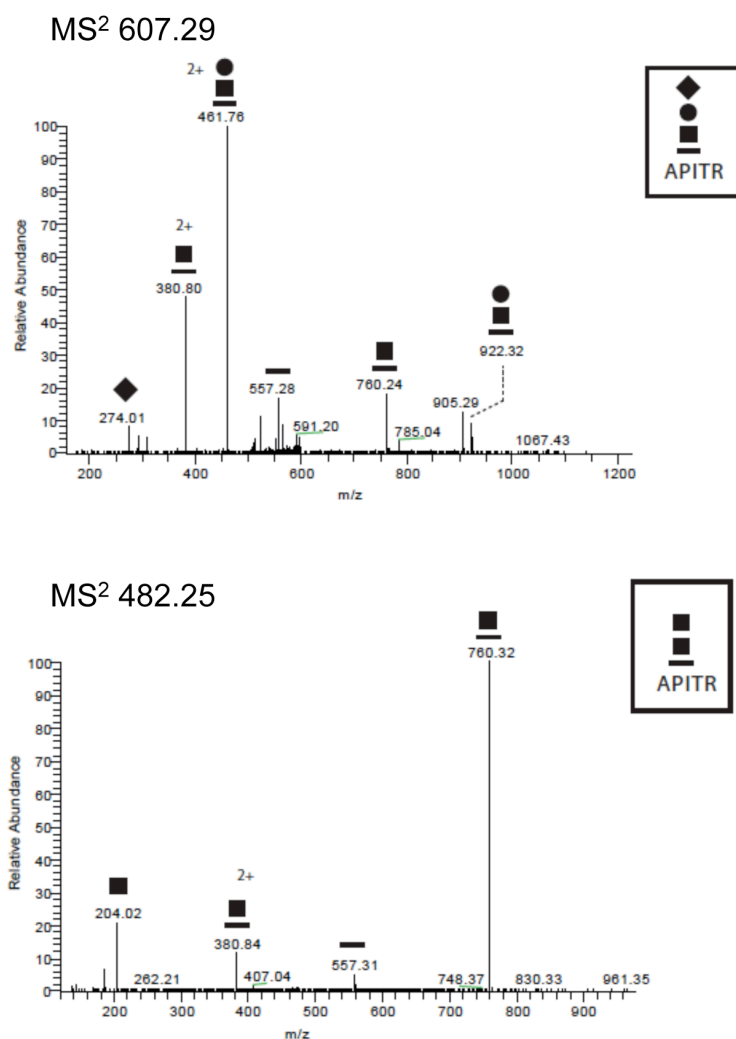


Figura 8. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” HexNAc-*O*-Thr presentes sobre el glicopéptido p460-468 (VTTKAPITR). Los O-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.

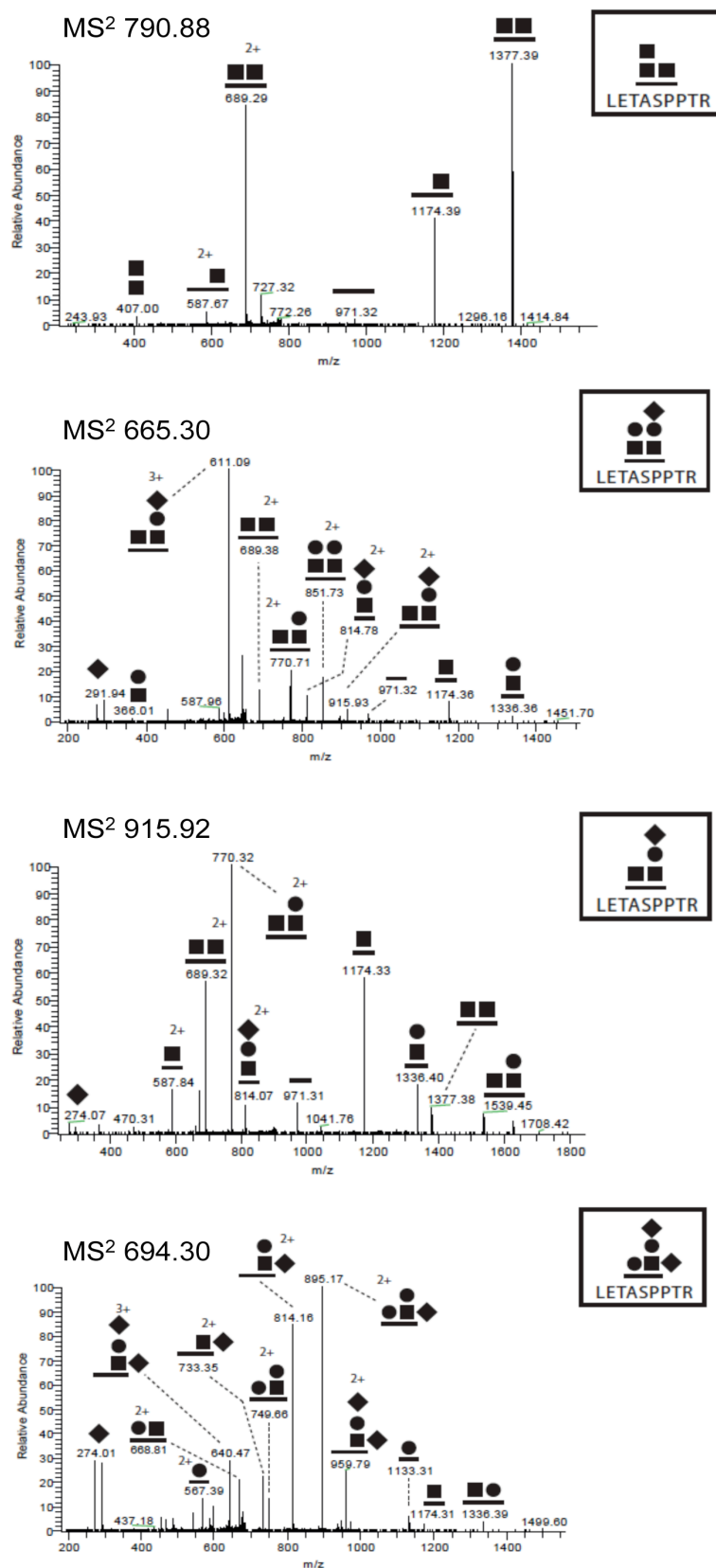


Figura 9. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” HexNAc-O-Ser/Thr presentes sobre el glicopéptido p469-477 (LETASPPTR). Los O-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.

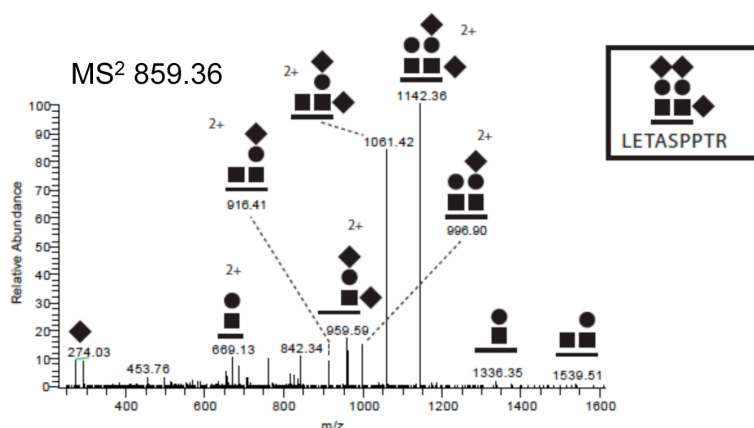


Figura 10. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” HexNAc-*O*-Ser/Thr presentes sobre el glicopéptido p469-477 (LETASPPTR). Los O-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.

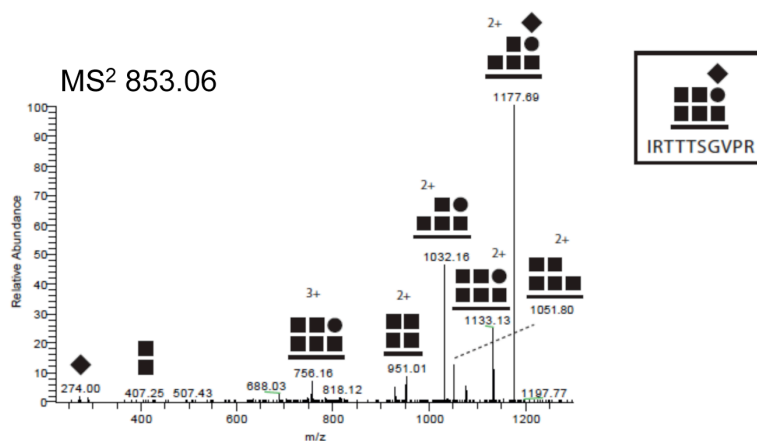
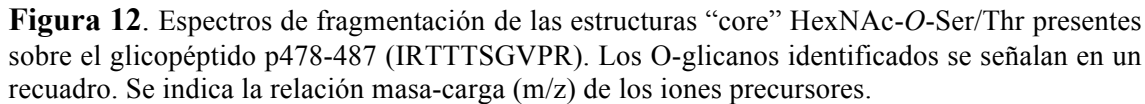


Figura 11. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” HexNAc-*O*-Ser/Thr presentes sobre el glicopéptido p478-487 (IRTTSGVPR). Los O-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.



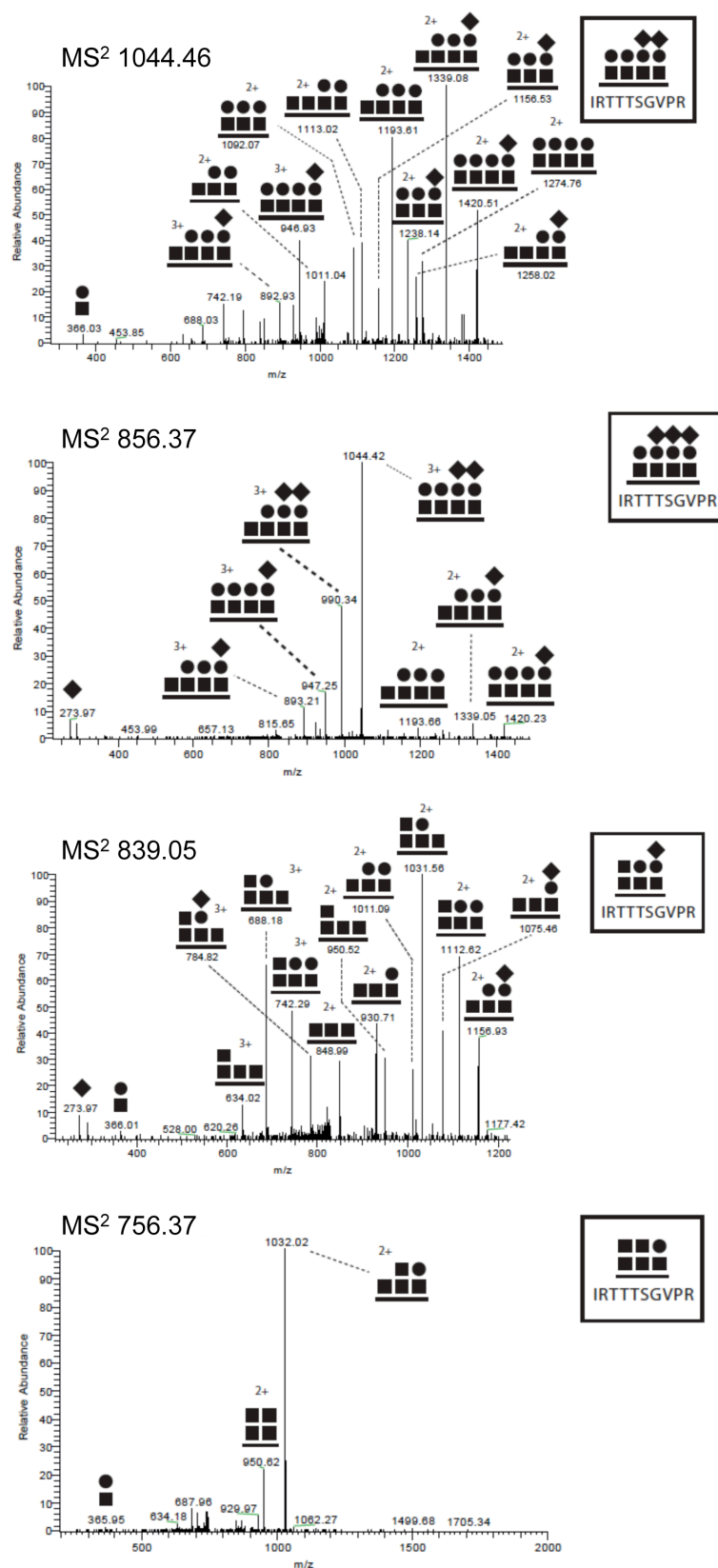


Figura 13. Espectros de fragmentación de las estructuras “core” HexNAc-O-Ser/Thr presentes sobre el glicopéptido p478-487 (IRTTSGVPR). Los O-glicanos identificados se señalan en un recuadro. Se indica la relación masa-carga (m/z) de los iones precursores.

Anexo 2

El trabajo desarrollado durante esta tesis doctoral ha dado lugar a la publicación del siguiente artículo:

Raducu M., Baets J., Fano O., Van Coster R. and Cruces J. “Promoter alteration causes transcriptional repression of the POMGNT1 gene in limb-girdle muscular dystrophy type 2O”. 2012. *Eur J Hum Genet*, Mar 14. doi:10.1038/ejhg.2012.40.

Durante la realización de la tesis la doctoranda ha participado en la realización del artículo:

Cotarelo R.P., Fano O., **Raducu M.**, Pena A., Tarilonte P., Mateos F., Simon R., Cabello A. and Cruces J. “A double homozygous mutation in the POMT1 gene involving exon skipping gives rise to Walker-Warburg syndrome in two Spanish Gypsy families”. 2009. *Clin Genet*, 76, 108-12.

ARTICLE

Promoter alteration causes transcriptional repression of the *POMGNT1* gene in limb-girdle muscular dystrophy type 20

Madalina Raducu¹, Jonathan Baets^{2,3}, Oihane Fano¹, Rudy Van Coster⁴ and Jesús Cruces^{*,1}

Limb-girdle muscular dystrophy type 20 (LGMD20) belongs to a group of rare muscular dystrophies named dystroglycanopathies, which are characterized molecularly by hypoglycosylation of α -dystroglycan (α -DG). Here, we describe the first dystroglycanopathy patient carrying an alteration in the promoter region of the *POMGNT1* gene (protein O-mannose β -1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1), which involves a homozygous 9-bp duplication (-83_-75dup). Analysis of the downstream effects of this mutation revealed a decrease in the expression of *POMGNT1* mRNA and protein because of negative regulation of the *POMGNT1* promoter by the transcription factor ZNF202 (zinc-finger protein 202). By functional analysis of various luciferase constructs, we localized a proximal *POMGNT1* promoter and we found a 75% decrease in luciferase activity in the mutant construct when compared with the wild type. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) revealed binding sites for the Sp1, Ets1 and GATA transcription factors. Surprisingly, the mutation generated an additional ZNF202 binding site and this transcriptional repressor bound strongly to the mutant promoter while failing to recognize the wild-type promoter. Although the genetic causes of dystroglycanopathies are highly variable, they account for only 50% of the cases described. Our results emphasize the importance of extending the mutational screening outside the gene-coding region in dystroglycanopathy patients of unknown aetiology, because mutations in noncoding regions may be the cause of disease. Our findings also underline the requirement to perform functional studies that may assist the interpretation of the pathogenic potential of promoter alterations.

European Journal of Human Genetics advance online publication, 14 March 2012; doi:10.1038/ejhg.2012.40

Keywords: dystroglycanopathy; *POMGNT1*; promoter; limb-girdle muscular dystrophy type 20

INTRODUCTION

Dystroglycanopathies are a heterogeneous group of congenital muscular dystrophies characterized by hypoglycosylation of α -dystroglycan (α -DG), an extensively glycosylated peripheral membrane protein, first isolated from skeletal muscle.¹ Dystroglycan is the central element of the dystrophin-glycoprotein complex (DGC) and connects the cytoskeleton to components of the extracellular matrix, such as laminin- α 2, neuexin, agrin, perlecan and pikachurin.² The correct O-glycosylation of α -DG is essential to maintain the structural stability of the sarcolemma in the muscle cell.³ Synthesis of the O-mannosyl glycan NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α -S/T, which is essential for dystroglycan to bind normally to laminin, begins with the addition of mannose moieties to serine and threonine residues from the mucin domain of α -DG because of the cooperative activity of the glycosyltransferases POMT1 and POMT2 (protein O-mannosyltransferases 1 and 2).⁴ The second step is catalyzed by POMGNT1 (protein O-mannose β -1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1), which transfers N-acetylglucosamine residues to O-linked mannose.⁵ The other enzymes that complete the extension of the tetrasaccharide chain have not yet been identified. However, mutations in the *FKTN* (*fukutin*), *FKRP* (*fukutin-related protein*) and *LARGE* (*like-glycosyltransferase*) genes have been described in patients with defective α -DG glycosylation.⁶ *POMGNT1* mutations (MIM 606822) were

first detected in muscle-eye-brain disease (MEB, MIM 253280),⁵ and they are known to impair the enzymatic activity of this protein.⁷ Subsequently, the clinical spectrum was expanded to include Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD, MIM 253800), a mild form of Walker–Warburg syndrome (WWS, MIM 236670), and a single patient with limb-girdle muscular dystrophy type 20 (LGMD20, MIM 613157).^{8,9} WWS, MEB and FCMD are the most severe forms of these conditions and they have common clinical manifestations, including muscular dystrophy and structural abnormalities of the brain and eye.⁶ Various forms of LGMD without brain and eye involvement are ranked at the milder end of the clinical spectrum.¹⁰

Here we describe the first dystroglycanopathy patient carrying a mutation in the *POMGNT1* promoter region. We present the complete functional analysis of the wild-type *POMGNT1* gene promoter, and we define the transcriptional and translational consequences of what is the first mutation in the promoter region of the *POMGNT1* gene known to give rise to the LGMD20 phenotype. This mutation promoted the binding of the transcriptional repressor ZNF202 (zinc-finger protein 202), provoking the downregulation of *POMGNT1* gene expression and, ultimately, defective α -DG glycosylation. Our study highlights the importance of functional characterization of promoters in dystroglycanopathies of unknown genetic causes.

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas ‘Alberto Sols’ UAM-CSIC, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain;

²Neurogenetics Group, VIB Department of Molecular Genetics, Antwerpen, Belgium; ³Laboratory of Ultrastructural Neuropathology, Institute Born-Bunge, University of Antwerp, Antwerpen, Belgium; ⁴Department of Pediatrics, Division of Pediatric Neurology and Metabolism, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium

*Correspondence: Professor J Cruces, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Calle Arzobispo Morcillo 4, Madrid 28029, Spain. Tel: +34 91 497 5406; Fax: +34 91 585 4401; E-mail: jesus.cruces@uam.es

Received 25 November 2011; revised 11 January 2012; accepted 2 February 2012

MATERIALS AND METHODS

Patient

The patient was an 11-year-old Belgian with LGMD that was associated with abnormal α -DG glycosylation on histological examination of a muscle biopsy.

Histological analysis and immunohistochemistry

A biopsy of the quadriceps muscle was performed at the age of 4 years and the sample was analyzed by histological, histochemical, histoenzymatic and immunohistochemical techniques, as described previously.¹¹ The antibodies against dystroglycan used were mouse monoclonal α -dystroglycan, IIH6C4 (1:500, Millipore, Schwalbach, Germany) and mouse monoclonal anti- β -dystroglycan (1:200, NCL-b-DG, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK). The avidin-biotin complex technique was used.

Mutation analysis

Genomic DNA from the patient and his parents was isolated from total blood samples using standard techniques. The coding exons, flanking intronic regions and polyadenylation sites of the *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1*, *FKTN*, *FKRP*, *LARGE* and *DAG1* genes were screened. A 5'-upstream region of ~650 bp was also screened for each gene. DNA samples taken from 200 healthy individuals were used as controls.

Cloning of the 5'-upstream region of the *hPOMGNT1* gene

A 2070-bp 5'-flanking region of the human *POMGNT1* gene up to the translation start codon (ATG) was amplified by PCR (Supplementary Table S1). The PCR product was cloned between the *HindIII* and *XhoI* sites of the promoterless pXP2 plasmid upstream of the firefly luciferase gene,¹² generating the construct pXP2(-1426/+644). Both the MatInspector (<http://www.genomatix.de/cgi-bin/eldorado/main.pl>) and TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) software programs were used to analyze the putative regulatory elements.

For CpG island prediction, CpG Plot (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/>) and MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) software programs were used.

Construction of reporter plasmids for promoter analysis

Progressive 5' and 3' deletion fragments of the *POMGNT1* promoter were generated by PCR. Promoter regions containing the mutation were amplified using genomic DNA extracted from patient's total blood sample. As a positive control, a HSVtk-pXP2 construct was generated using a 770-bp fragment of HSV thymidine kinase promoter. All PCR fragments were cloned into the *HindIII* and *XhoI* sites of the pXP2 vector (Supplementary Table S1).

Cell culture, transient transfection and reporter gene luciferase assay

The COS-7 (African Green Monkey kidney fibroblast) and HEK293T (human embryonic kidney) cell lines were maintained at 37°C with 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (both from Gibco, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Approximately 8 × 10⁵ cells were seeded in 60 mm² culture plates and the cells were then transiently co-transfected with 8 µg of the each luciferase reporter construct or the empty vector (negative control) together with 1.6 µg of the pSV- β -galactosidase plasmid as an internal control. The cells were harvested 48 h after transfection and assayed for both luciferase and β -galactosidase activities using the Luciferase assay system and the β -galactosidase enzyme assay system (Promega, Madison, WI, USA). To normalize the variations in transfection efficiency, we divided the measurement of firefly luciferase activity by that of β -galactosidase activity.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and supershift assay

Double-stranded probes containing putative wild-type and mutant binding sites (Supplementary Table S2) were end labelled with [γ -³²P]ATP using T4 polynucleotide kinase (Promega). The nuclear proteins were preincubated on ice for 15 min in a binding reaction mixture containing 20 mM Hepes, 70 mM NaCl, 2.5 mM DTT, 0.05% Nonidet P-40, 1 µg/ml BSA, 2% Ficoll and

2 µg poly (dI-dC). The ³²P end-labelled probe was added and the mixture was incubated for 20 min at RT. For the competition assay, a 100-fold molar excess of unlabelled probe was added. For the supershift assay, 2 µg of Sp1 antibody (sc-420X; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) and control murine IgG were incubated with the nuclear extracts.

Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP)

ChIP assay was carried out as previously described,¹³ using 4 µg of the Sp1 antibody (sc-420X) and FLAG M2 antibody (Stratagene, La Jolla, CA, USA). As a negative control, an immunoprecipitation reaction with no antibody was performed. Two different *POMGNT1* promoter regions containing the three analyzed Sp1-binding motifs were amplified by PCR. A fragment from the coding region of the *GAPDH* gene was used as a negative control.

Cloning of the cDNA and proximal promoter of the *POMGNT1* gene to analyze mRNA and protein expression

The coding region of the *hPOMGNT1* gene was amplified using the 3138971 clone from the IMAGE consortium¹⁴ and cloned into a pcDNA3 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing a Flag-tag. This construct, named P_{CMV}-*POMGNT1*-pcDNA3-Flag, preserved the CMV promoter of the original vector and served as the positive control. The T7 and CMV promoters of pcDNA3 vector were eliminated and the wild-type and mutant -402 to +644 bp promoter regions were inserted to generate the P_{WT}-*POMGNT1*-pcDNA3-Flag and P_{Mut}-*POMGNT1*-pcDNA3-Flag constructs, respectively.

Western blotting

COS-7 total protein extracts (30 µg of protein from P_{CMV}-*POMGNT1*-pcDNA3-Flag transfected cells or 150 µg of protein from P_{WT/Mut}-*POMGNT1*-pcDNA3-Flag transfected cells) were separated on 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to a PVDF membrane. The FLAG M2 antibody was used in a dilution of 1:1000. To confirm equal protein loading, the membranes were reprobed with a monoclonal antibody directed against β -actin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Signal intensity was quantified by densitometry using Image Gauge software, version 3.3 (Fujifilm, Valhalla, NY, USA).

RT-PCR

Total RNA was extracted from COS-7 cells using the TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized from 0.5 µg of total RNA with 200 U of SuperScript III RNase H reverse transcriptase (Invitrogen). The PCR primers were designed from the *Macaca mulatta* cDNA sequence of Sp1, Ets1, ZNF202 and GATA-1 to GATA-6 transcription factors (available upon request). A 200 bp fragment of β -actin was amplified as an internal control for each PCR reaction.

Quantitative RT-PCR

The assay was performed using the ABI 7900HT Sequence Detection System and Power SYBR Green PCR Master Mix (both from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For the *POMGNT1* gene the primers were: forward, 5'-TGACCC ACTCCAGACAACA-3'; and reverse, 5'-GTAGCCGTCATGAAACTG-3'. The relative expression of the target genes was normalized to that of 18S RNA.

Statistical analysis

Statistical significance was determined using a paired Student's *t*-test and the differences were considered statistically significant when *P* < 0.05. Analyses were performed using GraphPad Prism 4.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

RESULTS

Clinical description

The patient was born after 42 weeks of gestation with a birth weight of 3.49 kg and a length of 52 cm. Cognitive milestones were acquired at the expected ages, although his initial motor development was slightly delayed. At 9 months of age, the patient could sit without support, but was hypotonic and unable to acquire a sitting position unaided.

At about 2 years of age, he was unsteady when standing and lacked reflexes to protect himself against falling. Clinical examination revealed muscle weakness, slight generalized amyotrophy and a positive Gower's sign. At the age of 7 years, slight lumbar hyperlordosis was noticed along with difficulties in climbing stairs and continuous fatigue. By 8 years of age, profound weakness of the anterior tibialis muscles and shoulder girdle muscles were observed and his sitting was in a kyphotic position. Ophthalmological examination and a brain MRI revealed normal results. Laboratory evaluation showed a mild elevation of serum creatine kinase (283 IU/l and 389 IU/l at 2 and 7 years of age, respectively; the normal range is between 36 and 217 IU/l).

Histological analysis and immunohistochemistry

Light microscopy showed pronounced variation in muscle fibre diameters and numerous rounded atrophic fibres (Figure 1a). An increase of the endomysial connective tissue was observed, with fatty infiltration of the perimysium. Muscle fibres undergoing myophagy

were occasionally observed and several regenerating basophilic fibres with multiple enlarged nuclei were noted. No large inflammatory infiltrates were observed, nor were larger groups of necrotic and regenerating fibres evident. No abnormal accumulation of neutral lipids was detected. Immunohistochemistry revealed abnormal staining for α -DG, with clear immunoreactivity in some fibres and weak or no immunoreactivity in others (Figure 1b), even though normal staining was seen in a control biopsy (Figure 1c). β -DG, merosin and dystrophin immunoreactivity was normal (data not shown).

Genetic screening

Genomic DNA screening of the LGMD20 patient revealed a new homozygous mutation in the *POMGNT1* promoter, located upstream from the transcription start site (TSS), named -83_-75dup (Figure 1d). This mutation was detected in the heterozygous state in both parents, whereas it was absent in all 200 healthy control individuals.

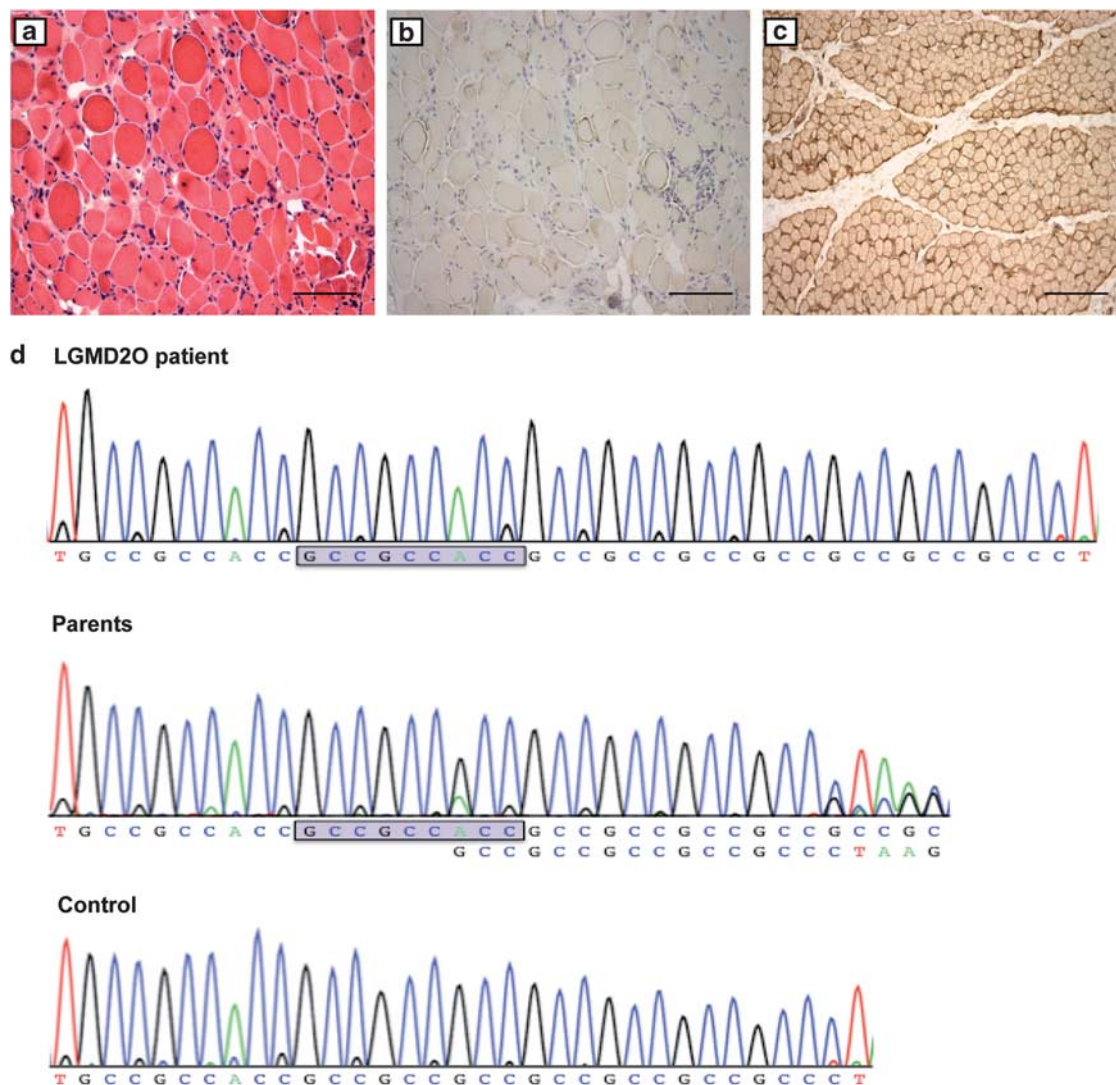


Figure 1 Histopathological findings from the quadriceps muscle biopsy and the sequence analysis of the *POMGNT1* gene promoter. (a) Trichrome staining showing variation in fibre size with an increase in endomysial connective tissue and fat in the perimysium. Magnification $\times 20$. (b) Immunolabelling of α -DG showing a marked reduction in IIH6 antibody immunoreactivity (avidin-biotin complex method). Magnification $\times 20$. (c) Immunolabelling of α -DG in control muscle (avidin-biotin complex method). Magnification $\times 20$. Scale bars = 100 μ m. (d) Electropherograms of the sequence analysis indicating a novel homozygous mutation -83_-75dup (rectangle) in the *POMGNT1* promoter region of the LGMD20 patient. Both parents carry the heterozygous form of this mutation. Bottom electropherogram indicates the wild-type sequence.

Analysis of the 5'-flanking region of the *hPOMGNT1* gene

The 2070-bp 5'-flanking region of the *hPOMGNT1* gene was examined using the MatInspector and TFSEARCH software programs. This analysis detected several putative transcription factor binding sites, some of which are indicated in Figure 2a. The TSS was set according to the EST sequence BI462048.1, which has an additional 16 nucleotides upstream of the first nucleotide of the published sequence (Gen Bank NM_017739.3). No proximal TATA or CCAAT boxes

were found in this region, although the CpGPlot and MethPrimer search programmes identified a CpG island of 440bp within the region -198/+219 relative to the TSS.

Functional characterization of the wild-type *hPOMGNT1* promoter region

To localize the DNA elements critical for promoter activity, we generated a series of bidirectional deletion constructs of the 2070-bp

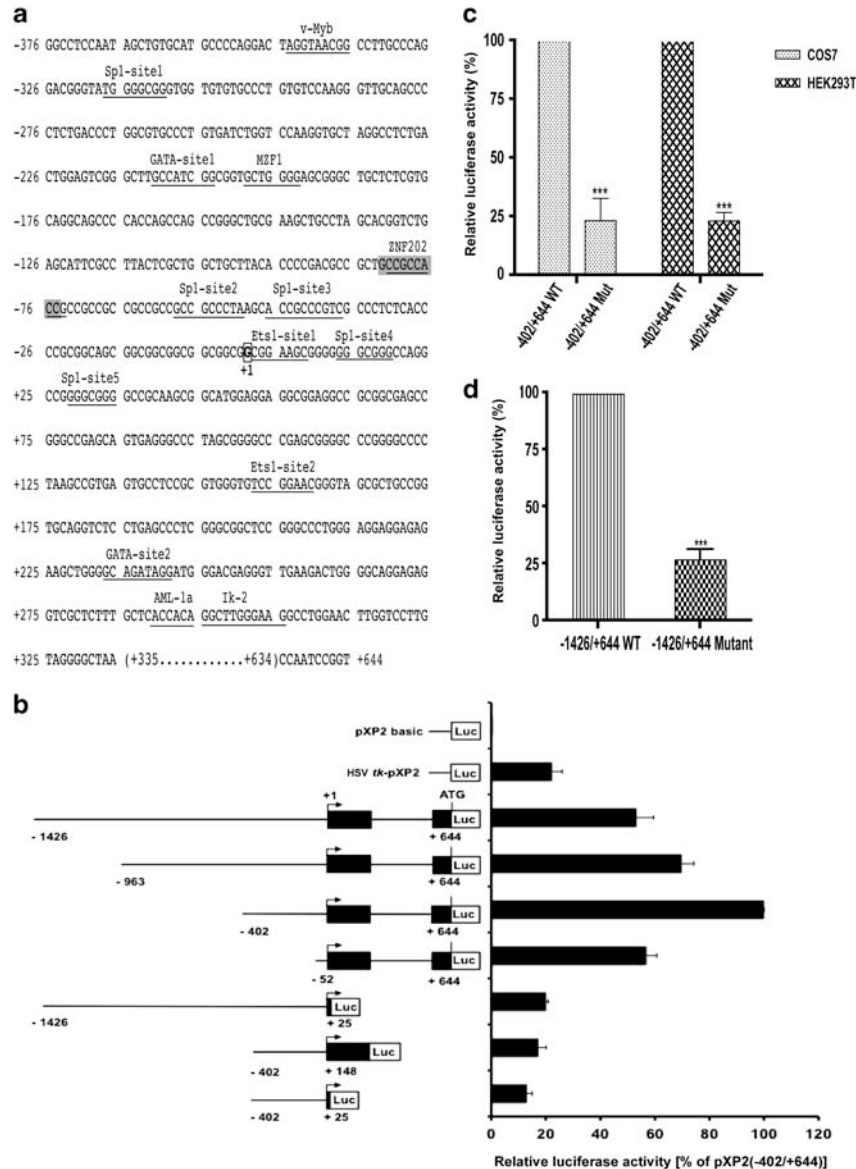


Figure 2 Characterization of the 5'-flanking region of the *hPOMGNT1* gene. **(a)** Nucleotide sequence of the *hPOMGNT1* promoter. The putative transcription factor binding sites are underlined and the names annotated. The transcription start site (TSS) is shown as +1 in bold and boxed; the duplicated sequence is shaded. **(b)** Reporter gene analysis of the 5'-flanking region of the *hPOMGNT1* gene. The schematic diagram on the left indicates the *hPOMGNT1* promoter luciferase gene constructs analyzed. The fragments of the *POMGNT1* promoter mutants were inserted into the pXP2 vector and co-transfected with the pSV- β -galactosidase plasmid into the COS-7 cell line. Normalized Luc activity is shown as a percentage of that of the pXP2(-402/+644) construct. Each bar represents the mean \pm SEM of three independent experiments. **(c, d)** Reporter gene analysis of the *POMGNT1* promoter from the LGMD20 patient. **(c)** The *POMGNT1* promoter region from -402 to +644bp carrying the homozygous mutation -83_-75dup and the wild-type region were cloned into the pXP2 vector. This vector was co-transfected with the pSV- β -galactosidase plasmid into COS-7 and HEK293T cells. Normalized Luc activity of the -402 to +644 bp mutant promoter region is shown as a percentage of that of the wild-type pXP2(-402/+644) plasmid. Each bar represents the mean \pm SEM of three independent experiments. *** $P < 0.0001$ (Student's *t*-test). **(d)** The *POMGNT1* promoter region from -1426 to +644 bp carrying the homozygous mutation -83_-75dup and the wild-type region were cloned into the pXP2 vector and co-transfected with the pSV- β -galactosidase plasmid into the COS-7 cell line. Normalized Luc activity of the -1426 to +644 bp mutant promoter region is shown as a percentage of that of the wild-type pXP2(-1426/+644) plasmid. Each bar represents the mean \pm SEM of three independent experiments. *** $P < 0.0001$ (Student's *t*-test).

5'-flanking region of the *hPOMGNT1* gene. Deletion fragments containing 5'-ends ranging from -1426 to -52 bp and 3'-ends ranging from +644 to +25 bp were generated by PCR and cloned into the promoterless firefly pXP2 luciferase reporter vector (Figure 2b, left panel). Of all the constructs, the pXP2(-402/+644) construct expressed the highest level of promoter activity (Figure 2b, right panel) and when the 5'-end of this sequence was extended from -402 bp to -963 bp, there was a slight decrease in luciferase activity. Indeed, extending the 5' sequence from -402 bp to -1426 bp resulted in a 50% decrease in luciferase activity, suggesting the presence of suppressor activity in this distal 5'-flanking region. Sequence deletion from -402 bp to -52 bp resulted in a reduction in luciferase activity of almost 45%, indicating the presence of a putative regulatory element in this region that is important for promoter activity. Significantly, a binding site for the Sp1 transcription factor was predicted in this region (Sp1 site 1).

A significant reduction of nearly 80% in promoter activity was observed after eliminating the +148 to +644 bp region, which contains a predicted binding site for GATA family transcription factors (GATA site 2). Further deletion of the region +25 to +148 bp produced a decrease of nearly 90% in the promoter activity of the pXP2(-402/+24) and pXP2(-1426/+24) constructs.

Mutant *hPOMGNT1* promoter significantly inhibits luciferase activity

We used a luciferase reporter assay to determine whether the -83_-75dup mutation detected in the promoter of the LGMD20 patient's *POMGNT1* gene could affect its expression. Transient transfection in COS-7 and HEK293T cells revealed a 75% decrease in activity of the mutant pXP2(-402/+644Mut) construct when compared with the wild-type construct in both cell lines (Figure 2c). The same result was obtained for the mutant pXP2(-1426/+644Mut) construct (Figure 2d), suggesting that the -83_-75dup mutation strongly affected promoter activity in this patient.

Transcription factor binding to the wild-type *hPOMGNT1* proximal promoter

The deletion analysis suggested that the -402 to +644 bp region represents the proximal promoter of the *POMGNT1* gene and that it contains essential transcription factor binding sites required for gene expression. In order to confirm whether Sp1, Ets1 and members of the GATA family of transcription factors bind to the *POMGNT1* promoter, EMSA analysis was performed using radiolabelled probes containing: the Sp1 sites 1, 4, and 5; the Ets1 site 1; and the GATA site 2 (Figure 3a). When the wild-type radiolabelled probes were incubated with COS-7 nuclear extracts, a major band was retarded. The specificity of this binding was evident as the formation of the DNA-protein complexes could be inhibited by competition with a 100-fold molar excess of cold wild-type probe but not with a 100-fold molar excess of the cold mutant probe.

The identity of the Sp1 protein in the DNA-protein complexes was further confirmed in supershift assay, in which the DNA-protein complexes faded away (Figure 3b).¹⁵ We evaluated the conservation of the three Sp1-binding sites in the *Macaca mulatta* *POMGNT1* promoter (homologous to *Chlorocebus aethiops*) and multiple alignments using the Clustal W software program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) revealed a high degree of conservation between the two species for the Sp1-, Ets1- and GATA-binding sites (Figure 3c). To confirm that Sp1 bound to the three EMSA-detected sites *in vivo*, we performed ChIP assay using chromatin from COS-7 cells (Figure 3d). Two 111 bp and 143 bp fragments of the *POMGNT1*

promoter were amplified using DNA samples immunoprecipitated with the Sp1 antibody as a template. Together with a 144 bp fragment corresponding to a coding region of *GAPDH* gene, these two fragments were also amplified using the input material as templates. When DNA samples immunoprecipitated with an anti-FLAG M2 antibody or with no antibody were used as templates, no fragments were amplified with either the *POMGNT1* or *GAPDH* primers.

The transcriptional repressor ZNF202 binds strongly to the mutant proximal promoter of the *POMGNT1* gene

Given the decrease in luciferase activity of the LGMD20 patient's *POMGNT1* promoter, we reassessed the potential transcription factor binding sites and we identified a putative binding site for the transcriptional repressor ZNF202 in the wild-type promoter region (Figure 2a). The mutation in the LGMD20 patient generated a second binding site for this transcription factor, which suggested that the repression of this gene's transcription might be stronger following the introduction of this mutation. To confirm this *in silico*-based hypothesis, an EMSA assay was performed to confirm the binding of ZNF202 using the following probes: the wild-type probe containing the putative ZNF202 binding site (ZNF202 WT), the probe containing the mutant ZNF202 site (ZNF202 Mut) and the probe containing the -83_-75dup mutation (ZNF202 Dup) (Supplementary Table S2). No DNA-protein complexes were formed when the nuclear extracts were incubated with the labelled ZNF202 WT probe, whereas a strongly labelled band was retarded when the labelled ZNF202 Dup probe was used (Figure 4a). The specificity of this interaction was confirmed by the absence of a band when the labelled ZNF202 Mut probe was used. This labelled band could not be competed by a 100-fold molar excess of cold ZNF202 WT or ZNF202 Mut probes, demonstrating that the wild-type promoter showed no affinity for this transcription factor. However, competition with an excess of cold ZNF202 Dup probe abolished the gel shift because of the strong association of the nuclear extracts with the promoter region containing the mutation. It was not possible to identify ZNF202 as part of the protein complex bound to the mutant proximal promoter by supershift or ChIP assay as no commercial specific antibodies were available. However, ZNF202 was identified in gel shift assay using a control probe containing a previously described ZNF202 consensus sequence (ZNF202 Ctrl: Supplementary Table S2).¹⁶ Incubation of the radiolabelled ZNF202 Dup probe with a nuclear extract generated a complex band, which was no longer evident when binding was competed by the addition of a 100-fold molar excess of cold ZNF202 Ctrl probe (Figure 4a). We also examined the endogenous expression of Sp1, Ets1, ZNF202 and the GATA-1 to GATA-6 transcription factors in the COS-7 cell line by RT-PCR, confirming that all the transcription factors analyzed, except for GATA-4, were expressed in COS-7 cells (Supplementary Figure 1).

Transcriptional repression and altered *POMGNT1* protein expression in the LGMD20 patient

Because we had no access to RNA or muscle samples from the patient, we performed an *in vitro* approach to assess the transcriptional activity of the *POMGNT1* promoter. When analyzed by qRT-PCR, the expression of the *POMGNT1* gene was by ~50% in cells transfected with the construct containing the mutant promoter (Figure 4b). Likewise, in western blots, a 70% decrease in the *POMGNT1* protein was detected for the mutant construct when compared with the wild type (Figures 4c and d). Together, these findings suggest that ZNF202 transcription factor strongly suppresses promoter activity, provoking a decrease in the endogenous *POMGNT1* mRNA and protein expression.

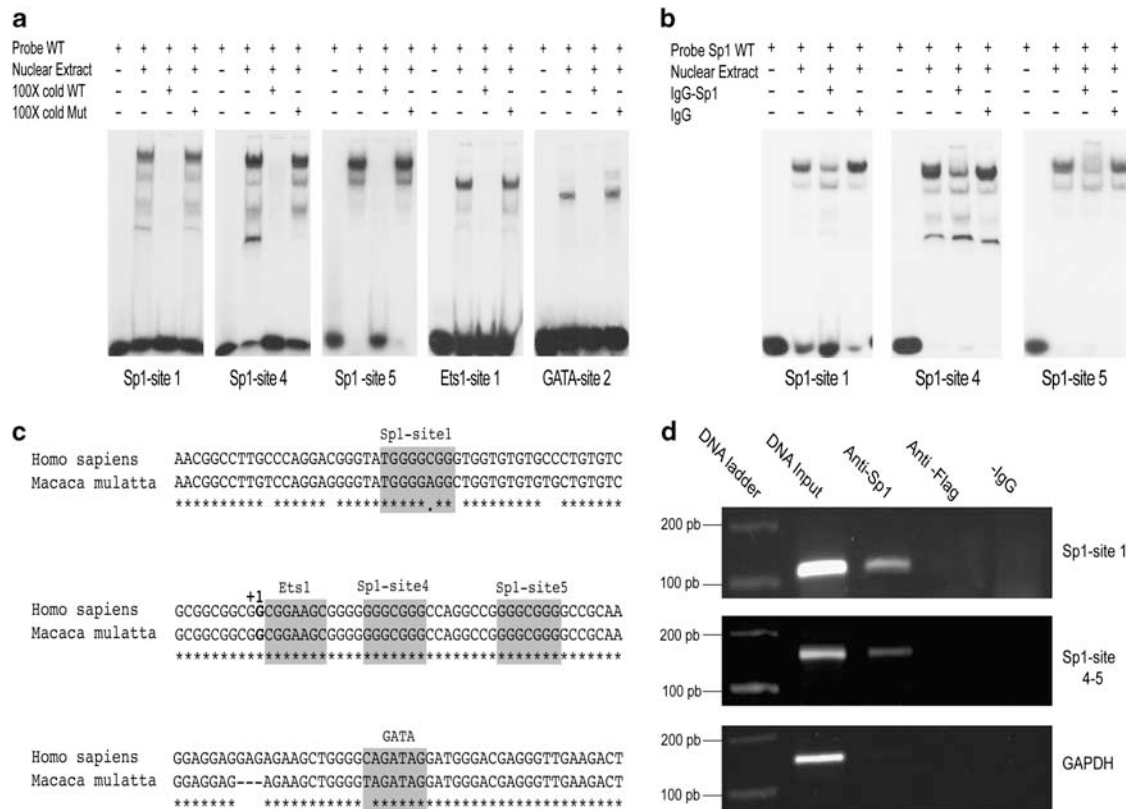


Figure 3 Identification of the transcription factors that bind to the *hPOMGNT1* proximal promoter. **(a)** Electrophoresis mobility shift assay of the *POMGNT1* promoter region. The ³²P-labelled wild-type (WT) probes containing Sp1-binding sites 1, 4 and 5 (first three panels, from left to right), the Ets1-binding site 1 (fourth panel) and the GATA-binding site 2 (fifth panel) were incubated with COS-7 nuclear extracts. For each panel: lane 1, free labelled probe (negative control); lane 2, specific DNA-protein complexes whose formation was hampered by co-incubation with an excess of the cold WT probe (lane 3) but not by co-incubation with an excess of cold Mut probe (lane 4). **(b)** Sp1 supershift assay. For each panel: lane 1, free labelled probe (negative control). ³²P-labelled probes containing the Sp1-binding sites 1 (first panel), site 4 (second panel) and site 5 (third panel) were incubated with COS-7 nuclear extracts. Lane 2, specific DNA-protein complexes whose formation was prevented by the addition of anti-Sp1 antibody (lane 3) but not by a mouse IgG (lane 4). **(c)** Sequence comparison of Sp1-, Ets1- and GATA-binding sites between *Homo sapiens* and *Macaca mulatta* (Gen Bank accession no. NC_007858.1). The highly conserved transcription factor binding sites are shaded. **(d)** Chromatin immunoprecipitation assay was performed on the COS-7 cell line. Proteins were crosslinked to the DNA with formaldehyde, and the chromatin was subsequently sonicated and pre-cleared with protein G beads. Lane 1, DNA ladder; lane 2, DNA input. Equivalent amounts of chromatin were immunoprecipitated by antibodies against Sp1 (lane 3) or FLAG (nonspecific antibody used as negative control; lane 4). Lane 5, sample without antibody. PCR was performed using the *POMGNT1* (top and middle panels) and *GAPDH* primers (bottom panel).

DISCUSSION

The *POMGNT1* gene is located on chromosome 1p34.1 and it encodes a 660-amino acid type II transmembrane protein that catalyzes the formation of GlcNAc β 1-2Man linkage of O-mannosyl glycans.⁵ Mutations in *POMGNT1* were almost exclusively associated with MEB, although a LGMD patient with severe myopia and normal intellect was reported.⁹ This LGMD patient carried a novel homozygous missense mutation in the coding region of *POMGNT1* and displayed a subtle reduction in α -DG immunolabelling in skeletal muscle.

Here we describe a second LGMD patient without brain abnormalities, mental retardation or ocular involvement, and who carries a homozygous 9-bp duplication (-83_-75dup) in the promoter region of the *POMGNT1* gene. The changes observed in the muscle biopsy from this patient were compatible with a muscular dystrophy, and extensive immunohistochemical analysis suggested a diagnosis of α -dystroglycanopathy: a mosaic pattern of IIH6-positive and IIH6-negative fibres across the muscle as previously described in some LGMD2I patients,¹⁷ including one CMD-MR patient who carried two heterozygous mutations in the *POMT1* gene.¹⁸ Labelling of other

membrane proteins was positive, precluding other types of LGMD. Thus, this individual is the first dystroglycanopathy patient to be described carrying a mutation in the promoter region of one of the genes directly or indirectly implicated in the α -DG glycosylation pathway.

Gene reporter analysis showed that the -402 to +644 bp region of the *POMGNT1* promoter exhibited maximal luciferase activity. In turn, the same region carrying the 9 bp duplication found in the LGMD2O patient showed a 75% decrease of luciferase activity in two different cell lines, confirming that downregulation of gene expression was not cell line specific. Indeed, similar findings were obtained for the mutant -1426 to +644 bp promoter region. EMSA, supershift and ChIP assays confirmed the existence of three binding sites for the Sp1 transcription factor. These sites contained the Sp1 consensus-binding sequence (5'-GGGCGG-3') and they were located within the CpG island at the positions: -318 to -310 bp, +13 to +19 bp and +28 to +34 bp. Sp1 belongs to the family of transcription factors with a zinc-finger-type DNA binding domain that binds to GC-rich sequences.¹⁹ In many TATA-less promoters, Sp1 binding is required to determine the transcription start site.²⁰ Another transcription factor potentially

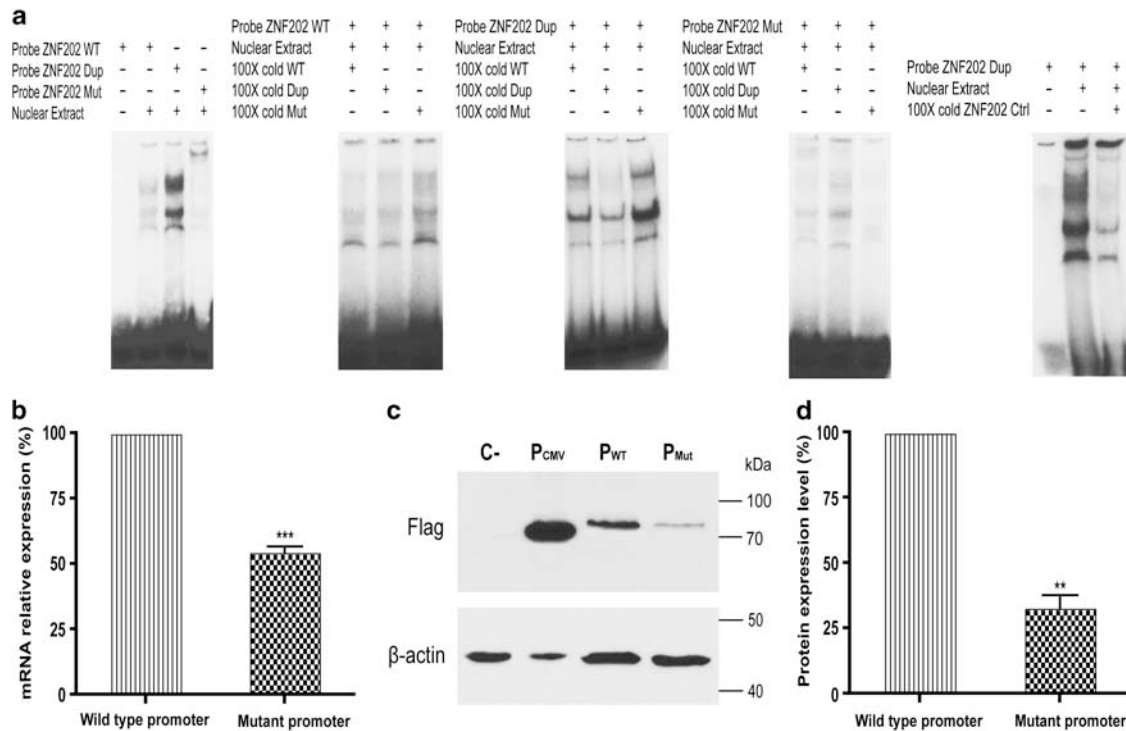


Figure 4 Functional characterization of the *POMGNT1* promoter mutation -83_-75dup. (a) Electrophoresis mobility shift assay shows that ZNF202 transcription factor binds to the mutant *POMGNT1* promoter. First panel: lane 1, free labelled probe (negative control). COS-7 nuclear extracts bound to labelled ZNF202 Dup probe (lane 3) but not to ZNF202 WT probe (lane 2) and ZNF202 Mut probe (lane 4). Competition of the ³²P-labelled ZNF202 WT probe (second panel), ³²P-labelled ZNF202 Dup probe (third panel) and ³²P-labelled ZNF202 Mut probe (fourth panel) using an excess of the cold probes. Fifth panel: lane 1, free-labelled probe (negative control); lane 2, specific DNA-protein complexes whose formation was impaired by the addition of an excess of cold ZNF202 Ctrl probe (lane 3). (b–d) Decreased expression of *POMGNT1* mRNA and protein in the LGMD20 patient. The three constructs together with the empty vector (C-) were transfected into COS-7 cells. Total RNA and protein was extracted 48 h later. (b) *POMGNT1* mRNA expression detected by qRT-PCR. The mutant promoter activity was normalized to 18S RNA and expressed relative to that of the wild-type promoter. Each bar represents the mean ± SEM of three independent experiments. ****P* < 0.0001 (Student's *t*-test). (c) The amount of POMGNT1 (top panel) and actin (bottom panel) protein was determined by western blotting assays. The CMV promoter (lane 2), wild-type (lane 3) or mutant (lane 4) *POMGNT1* promoters drove gene expression. Individual western blots were performed three times and a representative image is shown. (d) Quantification of POMGNT1 protein normalized to actin. POMGNT1 protein produced by the mutant promoter was expressed relative to that of wild type. Each bar represents the mean ± SEM of three independent experiments. ***P* < 0.009 (Student's *t*-test).

implicated in the transcriptional regulation of *POMGNT1* gene is Ets1, which binds to the core (5'-GGAA/T-3') sequence. Our EMSA assay detected one Ets1-binding site located in the +2 to +8 bp region. Sp1/Sp3, AP1 and SRF are thought to be coregulators of Ets1 binding.²¹ The +233 to +241 bp promoter region contains a GATA-binding motif that exhibits the nucleotide sequence 5'-(A/T)GATA(A/T)-3'. RT-PCR assays demonstrate that COS-7 cells endogenously express all members of the GATA transcription factor family, except GATA-4.

The experiments described here represent the first functional characterization of the *POMGNT1* gene and they demonstrate the importance of the Sp1, Ets1 and GATA transcription factors for the transcriptional activity of this gene. The promoter regions of the other putative or demonstrated glycosyltransferases involved in the glycosylation pathway of α-DG also contain potential binding sites for these transcription factors, which may account for a common transcriptional regulatory mechanism (data not shown). The complete functional analysis of the *POMGNT1* gene promoter harbouring the -83_-75 dup mutation revealed a reduction in gene expression, demonstrated by the low levels of *POMGNT1* mRNA and protein. This decrease in promoter activity may be associated with the strong binding of the transcription factor ZNF202 to the mutant promoter, which contains two consecutive ZNF202 binding sites. Interestingly, the wild-type

promoter contains a single predicted ZNF202-binding site but this does not appear to be sufficient to bind to ZNF202 *in vitro*. The influence of this transcription factor on *POMGNT1* expression is supported by the strong *in vitro* binding of the transcriptional repressor to direct repeats of the consensus binding motif (5'-GGGGT-3') in the promoter region of several genes involved in lipid metabolism, such as apolipoprotein AIV, apolipoprotein CIII and lipoprotein lipase, as well as to genes involved in blood vessel maintenance like VEGF.¹⁶ In addition to its affinity for GnT motifs, ZNF202 can bind to GC boxes, and in our case, ZNF202 bound to direct repeats of the 5'-GCCA-3' motif. Structurally, ZNF202 contains a SCAN (SRE-ZBP, CT-finS1, AW-1 and Number 18) oligomerization domain, a KRAB (Krüppel-associated box) repression domain and eight zinc-finger DNA-binding motifs. For TATA box-containing promoters the mechanism of ZNF202-induced transcriptional repression may be mediated by the KRAB repression domain, which interferes with the TATA box-dependent basal transcription machinery.²² Further studies will be necessary to elucidate the mechanism by which ZNF202 mediates transcriptional repression for promoters lacking a TATA box.

To date, in dystroglycanopathy patients defects have been described in six putative or demonstrated glycosyltransferases (POMT1,

POMT2, POMGNT1, LARGE, FKTN and FKRP), two accessory proteins of glycosyltransferases (DPM3 and DPM2) and the dystroglycan protein.¹ Despite this genetic variability, the mutations reported account for only about 50% of dystroglycanopathy patients. Moreover, to our knowledge, no alterations in the promoter regions of these genes have been reported previously. Thus, we describe here the first alteration in the promoter of a gene involved in the α -DG glycosylation pathway, which diminishes the *POMGNT1* mRNA and protein levels because of ZNF202-mediated repression of gene transcription. Our data underline the importance of screening the promoter and other 5'-upstream regulatory regions in dystroglycanopathy patients in whom mutations are not detected in the gene-coding region. Mutations within regulatory elements or transcription factor binding sites can affect normal transcriptional activity, resulting in the synthesis of hypoglycosylated α -DG. Therefore, the complete functional characterization of the promoters of previously described genes could help identify the genetic bases for the many dystroglycanopathies of currently unknown aetiology.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Cristina Lendínez and Belén García for their excellent technical assistance, and Mark Sefton for critical reading of the manuscript. This work was supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI09/0343). MR is supported by a FPU-UAM fellowship. JB is supported by a fellowship of the Fund for Scientific Research (FWO-Flanders).

- 1 Godfrey C, Foley AR, Clement E, Muntoni F: Dystroglycanopathies: coming into focus. *Curr Opin Genet Dev* 2011; **21**: 278–285.
- 2 Hewitt JE: Abnormal glycosylation of dystroglycan in human genetic disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1792**: 853–861.
- 3 Campbell KP: Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 1995; **80**: 675–679.

- 4 Manya H, Chiba A, Yoshida A *et al*: Demonstration of mammalian protein O-mannosyl-transferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 500–505.
- 5 Yoshida A, Kobayashi K, Manya H *et al*: Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGNT1. *Dev Cell* 2001; **1**: 717–724.
- 6 Muntoni F, Torelli S, Brockington M: Muscular dystrophies due to glycosylation defects. *Neurotherapeutics* 2008; **5**: 627–632.
- 7 Manya H, Sakai K, Kobayashi K *et al*: Loss-of-function of an N-acetylglucosaminyl-transferase, POMGNT1, in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **306**: 93–97.
- 8 Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K *et al*: Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 527–534.
- 9 Clement EM, Godfrey C, Tan J *et al*: Mild POMGNT1 mutations underlie a novel limb-girdle muscular dystrophy variant. *Arch Neurol* 2008; **65**: 137–141.
- 10 Guglieri M, Straub V, Bushby K, Lochmuller H: Limb-girdle muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 2008; **21**: 576–584.
- 11 Martin JJ, Ceuterick C, Van Goethem G: On a dominantly inherited myopathy with tubular aggregates. *Neuromuscul Disord* 1997; **7**: 512–520.
- 12 Nordeen SK: Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* 1988; **6**: 454–458.
- 13 Lou G, Li Y, Chen B *et al*: Functional analysis on the 5'-flanking region of human FXR gene in HepG2 cells. *Gene* 2007; **396**: 358–368.
- 14 Lennon G, Auffray C, Polymeropoulos M, Soares MB: The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics* 1996; **33**: 151–152.
- 15 Won J, Yim J, Kim TK: Sp1 and Sp3 recruit histone deacetylase to repress transcription of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter in normal human somatic cells. *J Biol Chem* 2002; **277**: 38230–38238.
- 16 Wagner S, Hess MA, Ormonde-Hanson P *et al*: A broad role for the zinc finger protein ZNF202 in human lipid metabolism. *J Biol Chem* 2000; **275**: 15685–15690.
- 17 Brown SC, Torelli S, Brockington M *et al*: Abnormalities in alpha-dystroglycan expression in MDC1C and LGMD2I muscular dystrophies. *Am J Pathol* 2004; **164**: 727–737.
- 18 Jimenez-Mallebrera C, Torelli S, Feng L *et al*: A comparative study of alpha-dystroglycan glycosylation in dystroglycanopathies suggests that the hypoglycosylation of alpha-dystroglycan does not consistently correlate with clinical severity. *Brain Pathol* 2009; **19**: 596–611.
- 19 Smale ST, Schmidt MC, Berk AJ, Baltimore D: Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4509–4513.
- 20 Joliff K, Li Y, Johnson LF: Multiple protein-DNA interactions in the TATAA-less mouse thymidylate synthase promoter. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 2267–2274.
- 21 Sharrocks AD: The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 827–837.
- 22 Pengue G, Lania L: Kruppel-associated box-mediated repression of RNA polymerase II promoters is influenced by the arrangement of basal promoter elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 1015–1020.

Supplementary Information accompanies the paper on European Journal of Human Genetics website (<http://www.nature.com/ejhg>)

Letter to the Editor

A double homozygous mutation in the *POMT1* gene involving exon skipping gives rise to Walker-Warburg syndrome in two Spanish Gypsy families

To the Editor:

Alpha-dystroglycanopathies are a large group of autosomal recessive muscular dystrophies that involve defects in α -dystroglycan (α -DG) O-glycosylation. Walker-Warburg syndrome (WWS, OMIM 236670) is the most severe alpha-dystroglycanopathy, and affected infants rarely survive past the first year of life. The phenotype mainly involves muscle, eye and brain abnormalities associated with anomalous neuronal migration, and it overlaps with Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD, OMIM 253800) and muscle-eye-brain (MEB) disease (OMIM 253280), other severe alpha-dystroglycanopathies (1, 2). Mutations in six genes are known to cause alpha-dystroglycanopathies (3), all encoding known or putative glycosyltransferases: *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *fukutin*, *FKRP* and *LARGE* (4–10).

Mutations in *POMT1* are responsible for approximately 25% of WWS cases and its targeted disruption in mice provokes embryonic lethality (11). Murine *Pomt1* is predominantly expressed in the tissues most severely affected in WWS patients, this expression persisting in the muscles, eyes, brain and cerebellum (11, 12).

Here, we describe a double homozygous mutation in the *POMT1* gene in two unrelated Gypsy families, reflecting the often higher incidence of recessive diseases in endogamic populations.

Family 1. Two affected male siblings, patients 1.1 and 1.2, were born to second-degree cousins in a Spanish Gypsy family. Patient 1.1 had profound muscular hypotonia at birth and a creatine kinase (CK) value of 8,400 IU/L. Muscular dystrophy was later confirmed by biopsy although merosin appeared normal. The infant showed retromicrognathia, low implanted ears, microphthalmia, cataract, microcornia and retinal

dysplasia. Brain MRI identified type II lissencephaly, hydrocephalus, agenesis of the corpus callosum, hypomyelination, cerebellar and brain stem hypoplasia, and Dandy-Walker malformation. He died at 4 months. Patient 1.2 displayed similar symptoms and had a similar appearance to his brother, but there are no biological samples and his age of death was not determined.

Family 2. This affected male sibling, patient 2.1, was born to double first-degree cousins in a Spanish Gypsy family. The patient had profound paralysing muscle hypotonia and a CK value of 40,851 IU/L at birth. Muscle biopsy confirmed muscular dystrophy although merosin appeared normal. Ocular examination revealed microphthalmia and bilateral retinal detachment. The patient also exhibited hypertelorism, frontal bossing and low implanted ears. Brain MRI showed lissencephaly, hydrocephalus, agenesis of the septum pellucidum and of the posterior corpus callosum, and cerebellar hypoplasia. The patient died 10 days after birth.

Analysis of the complete coding region of the *POMT1* gene revealed a double homozygous mutation in both patients in reference to the most common *POMT1* splice variant (NM_001077365.1) (13). The first homozygous mutation, g.3553G>T (NC_000009.10), was found at the beginning of intron 4 at the exon–intron boundary (Fig. 1Aa). Indeed, the mutation produced the loss of the entire exon 4 in mRNA transcripts from patients 1.1 and 2.1 (Fig. 1Ab). As this loss of 17 amino acids did not alter the reading frame, the ensuing protein has 708 instead of 725 amino acids. Exon 4 is located at Loop 1 of the POMT1 protein, within the conserved pfam02366 domain (protein mannosyltransferase, PMT) that potentially influences the protein's

catalytic activity (14). This exon is highly conserved, with significant amino acid sequence identity (Fig. S1, supporting information online), and it is the same size in all studied organisms.

The second homozygous mutation found, c.1545C>G (Fig. 1Ac), predicts the p.Ser515Arg substitution in exon 16 of *POMT1*, a serine only conserved from birds to humans (Fig. S1). The same substitution has already been described in heterozygosity in an American WWS patient, although no additional mutations were found in this patient to account for the WWS phenotype (15). Recently, this mutation was found in heterozygosity in an Italian patient diagnosed with

congenital muscular dystrophy and mental retardation who also carried another mutation in the *POMT1* coding region (16), raising the possibility that this is a hot-mutation site in the gene.

Western blotting revealed a complete lack of glycosylated α -DG, which was confirmed by laminin overlay assay, while β -DG detection was normal (data not shown). Immunohistochemical analysis of muscle biopsies with VIA-4 antibody corroborated the alpha-dystroglycanopathy in both patients (Fig. 1Ba–c). However, the α -DG core protein was correctly located at the plasma membrane as assessed by the p α DAG antibody (Fig. 1Bd–f) and distributed within the cell, probably undergoing

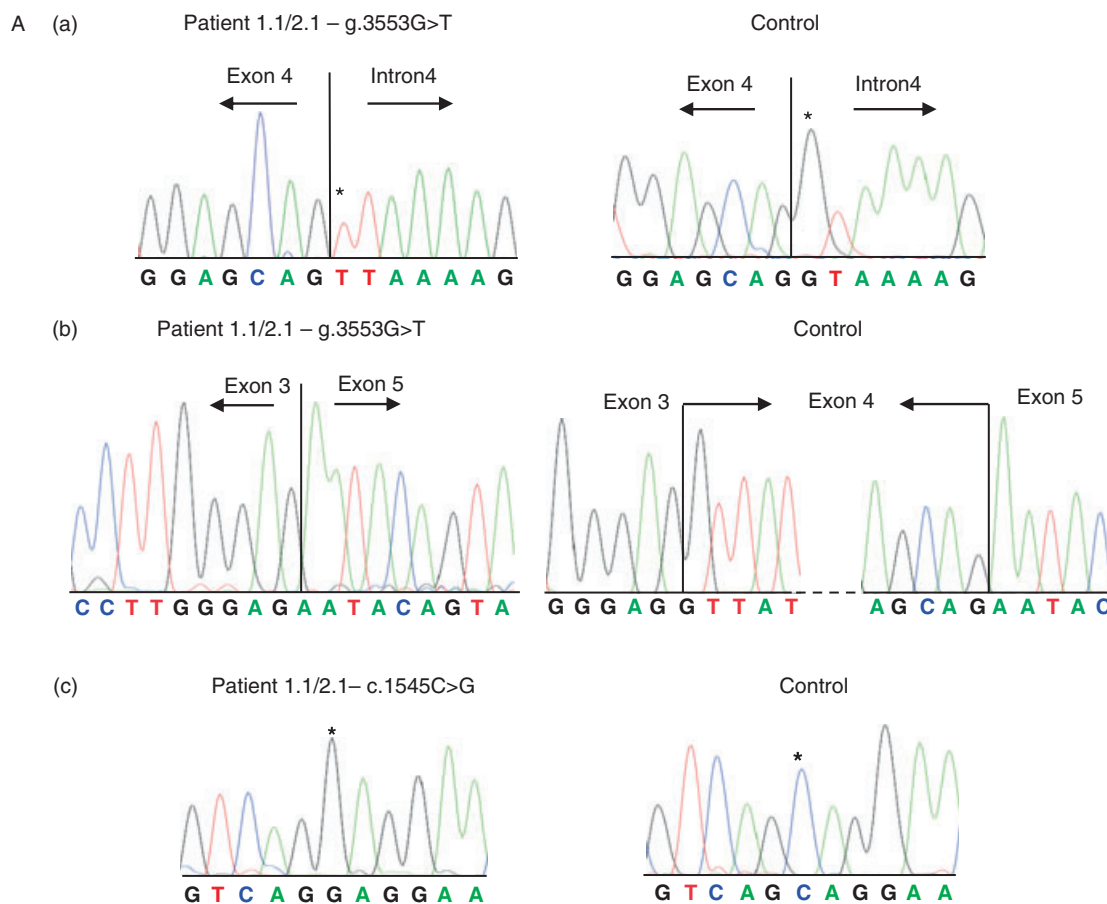


Fig. 1. Mutations detected in the patients studied and fluorescent immunohistochemical analysis of muscle tissue. **(A)** Mutations in the *POMT1* gene in patients 1.1 and 2.1. (a) Both patients carry the homozygous g.3553G>T transversion located at exon–intron boundary. (b) The *POMT1* mRNA lacks the entire exon 4 in both patients. (c) Patients 1.1 and 2.1 are also carriers of a second homozygous c.1545C>G transversion that predicts a p.S515R substitution. **(B)** Muscle biopsy from the control sample (first column) and patients 1.1 and 2.1 (second and third columns, respectively). Immunostaining with the VIA-4 antibody (a–c) shows normal expression in control muscle (a), but glycosylated is not detected in patients 1.1 and 2.1 (b,c). Detection of α -DG with the p α DAG antibody (d–f) identifies the protein in the plasma membrane of the cells, both in control tissue and in that from the patients, confirming the normal expression and localization of the α -DG core protein. Detection of β -DG and laminin (g–i) is normal in the control tissue and in tissue from patients. Immunostaining with the anti-*POMT1* antibody (m–o) and with the anti-calnexin antibody (p–r) shows that the distribution of *POMT1* and calnexin is very similar in control muscle (m,p). However, in patients 1.1 and 2.1 *POMT1* is only detected weakly in certain parts of the subsarcolemmic space and diffusely inside the cells (n,o). Calnexin is detected correctly in both patients (q,r).

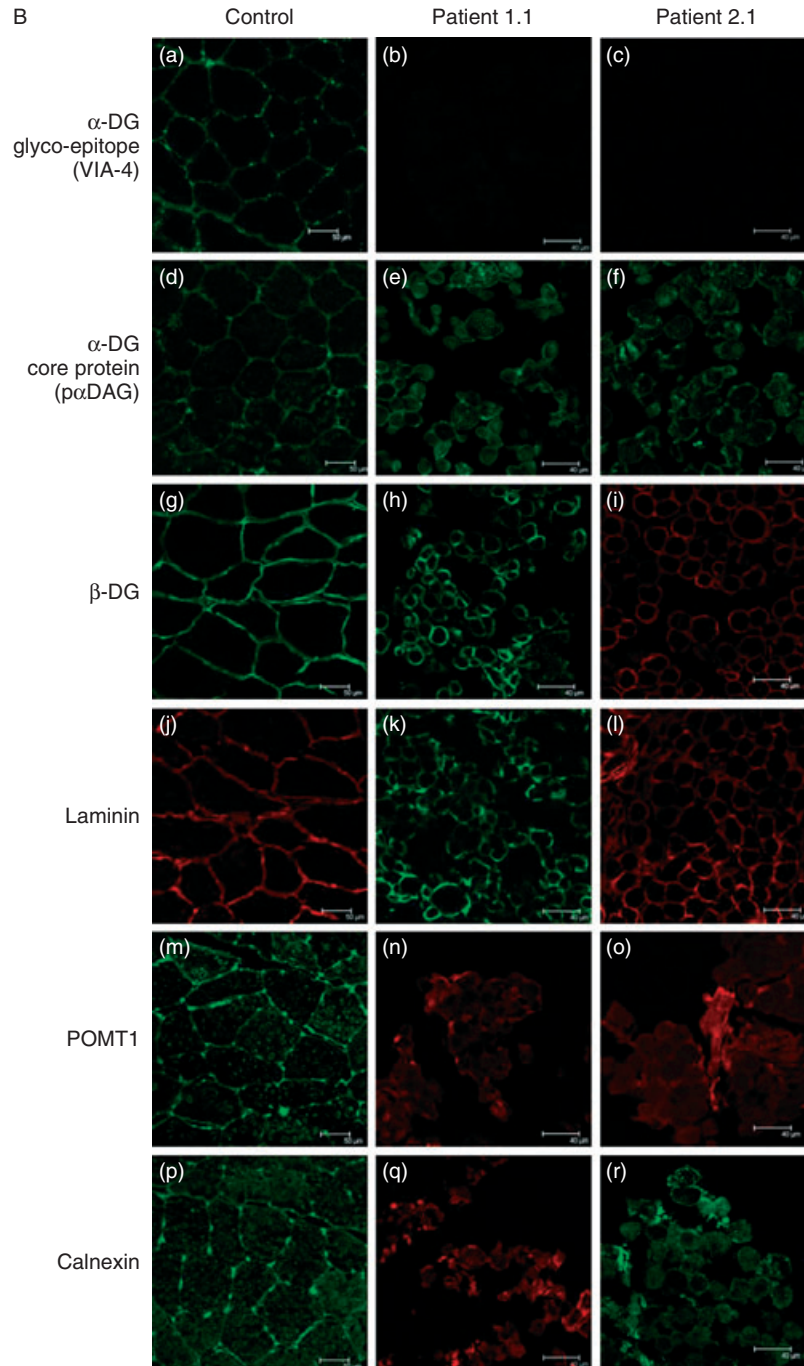


Fig. 1. (Continued).

post-translational modifications. Immunolabelling of β -DG and laminin was normal (Fig. 1Bg–l).

POMT1 is an integral endoplasmic reticulum (ER) membrane protein distributed in a similar pattern to the ER-marker calnexin. In muscle cells, the sarcoplasmic reticulum (SR) forms a network around the transverse T tubules that is continuous with the plasma membrane. In controls, POMT1 and calnexin were detected in the SR as part of

this network within the muscle cell, as well as in the subsarcolemmal space (Fig. 1Bm,p). While the distribution of calnexin did not appear to change in patients 1.1 and 2.1 (Fig. 1Bq,r), POMT1 was only located in certain parts of the subsarcolemma and diffusely within the cell (Fig. 1Bn,o).

The mutation g.3553G>T removes exon 4 from the *POMT1* transcript of patients 1.1 and 2.1 while preserving the open reading frame and the

epitope recognized by the anti-POMT1 antibody in Loop 5. Nevertheless, the distribution of POMT1 is altered, and it no longer co-localizes with calnexin, implying it has lost its ER-localization. This could be due to conformational changes in the POMT1 protein or to the degradation of the mutated protein inside the muscle cell. Staining for calnexin dismisses any major alterations to the SR in these patients (Fig. 1Bq,r).

Of these two mutations, the one causing exon 4 skipping is likely to be the most relevant for the WWS phenotype. In the second mutation, the substituted Ser515 is not very conserved and patients carrying this mutation do not provide much information about its relevance as none are homozygous carriers. Thus, although disease causing, this mutation might be responsible for milder phenotypes if not accompanied by a more severe change.

Founder effects have been reported for genes causing dystroglycanopathies in close-knit populations (17–20) and less so in families with no defined inbreeding (6, 16, 21–24). We recently reported a potential founder mutation in the *fukutin* gene in the Ashkenazi Jewish population (6) that was subsequently confirmed in a larger study (23, 24). Since both our subjects carrying the same homozygous mutations belong to unrelated Gypsy families, the mutations identified here could reflect a possible founder effect in the *POMT1* gene within the Spanish Gypsy population. Patients 1.1 and 2.1 came from families with a high degree of consanguinity and thus, it is likely that the parents of both patients were heterozygous carriers of the mutations. Unfortunately, no samples from the parents were available for studies. Inbreeding is very common in the Gypsy population, manifesting a high prevalence of phenotypes caused by recessive mutations and the transmission of these mutations. Further studies will be necessary to determine if this double mutation in the *POMT1* gene is widespread among the Spanish Gypsy population.

Acknowledgements

We are grateful to M. Sefton for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias' grant PI06/0378.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Fig. S1. Location of the mutations described on the POMT1 protein and conservation degree of the amino acids involved. (a) Predicted transmembrane structure for POMT1 in the ER, where the mutations found in patients 1.1 and 2.1 are marked in red. (b) Alignment of Serine 515. This serine is evolutionarily conserved in all vertebrates from birds (red), but not in the rest of organisms (blue). (c) Alignment of exon 4. This exon is conserved almost completely in vertebrates from Amphibia. The length of this exon (17 amino acids) is also identical in all organisms analysed, even in Porifera, indicating that it probably fulfils a functional role.

Please note: Wiley-Blackwell Publishing are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

RP Cotarelo^a

O Fano^a

M Raducu^a

A Peña^a

P Tarilonte^a

F Mateos^b

R Simón^b

A Cabello^c

J Cruces^a

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de

Investigaciones Biomédicas 'Alberto Sols'

UAM-CSIC, Facultad de Medicina, Universidad

Autónoma de Madrid, Madrid, Spain,

^bUnidad de Neurología Pediátrica, and

^cSección de Neuropatología, Departamento de

Anatomía Patológica, Hospital Universitario 12 de

Octubre, Madrid, Spain

References

1. van Reeuwijk J, Brunner HG, van Bokhoven H. Glyc-O-genetics of Walker-Warburg syndrome. *Clin Genet* 2005; 67: 281–289.
2. Martin PT. Mechanisms of disease: congenital muscular dystrophies-glycosylation takes center stage. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2: 222–230.
3. Martin PT. The dystroglycanopathies: the new disorders of O-linked glycosylation. *Semin Pediatr Neurol* 2005; 12: 152–158.
4. Silan F, Yoshioka M, Kobayashi K et al. A new mutation of the *fukutin* gene in a non-Japanese patient. *Ann Neurol* 2003; 53: 392–396.
5. de Bernabe DB, van Bokhoven H, van Beusekom E et al. A homozygous nonsense mutation in the *fukutin* gene causes a Walker-Warburg syndrome phenotype. *J Med Genet* 2003; 40: 845–848.
6. Cotarelo RP, Valero MC, Prados B et al. Two new patients bearing mutations in the *fukutin* gene confirm the relevance of this gene in Walker-Warburg syndrome. *Clin Genet* 2008; 73: 139–145.
7. Beltran-Valero de Bernabe D, Voit T, Longman C et al. Mutations in the *FKRP* gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* 2004; 41: e61.
8. van Reeuwijk J, Janssen M, van den Elzen C et al. *POMT2* mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* 2005; 42: 907–912.

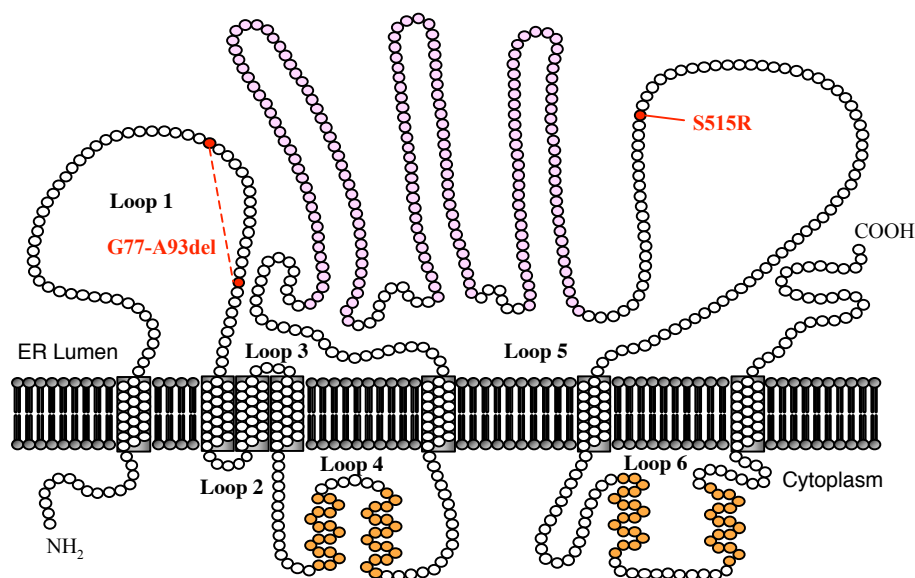
Letter to the Editor

9. van Reeuwijk J, Grewal PK, Salih MA et al. Intragenic deletion in the LARGE gene causes Walker-Warburg syndrome. *Hum Genet* 2007; 121: 685–690.
10. Godfrey C, Clement E, Mein R et al. Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain* 2007; 130: 2725–2735.
11. Willer T, Prados B, Falcon-Perez JM et al. Targeted disruption of the Walker-Warburg syndrome gene *Pomt1* in mouse results in embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 14126–14131.
12. Prados B, Peña A, Cotarelo RP, Valero MC, Cruces J. Expression of the murine *Pomt1* gene in both the developing brain and adult muscle tissues and its relationship with clinical aspects of Walker-Warburg syndrome. *Am J Pathol* 2007; 170: 1659–1668.
13. Manya H, Suzuki T, Akasaka-Manya K et al. Regulation of mammalian protein O-mannosylation: preferential amino acid sequence for O-mannose modification. *J Biol Chem* 2007; 282: 20200–20206.
14. Strahl-Bolsinger S, Scheinost A. Transmembrane topology of *pmt1p*, a member of an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases. *J Biol Chem* 1999; 274: 9068–9075.
15. Currier SC, Lee CK, Chang BS et al. Mutations in *POMT1* are found in a minority of patients with Walker-Warburg syndrome. *Am J Med Genet A* 2005; 133: 53–57.
16. Messina S, Mora M, Pegoraro E et al. *POMT1* and *POMT2* mutations in CMD patients: a multicentric Italian study. *Neuromuscul Disord* 2008; 18: 565–571.
17. Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K et al. Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 527–534.
18. Diesen C, Saarinen A, Pihko H et al. *POMGnT1* mutation and phenotypic spectrum in muscle-eye-brain disease. *J Med Genet* 2004; 41: e115.
19. Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M et al. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998; 394: 388–392.
20. Watanabe M, Kobayashi K, Jin F et al. Founder SVA retrotransposal insertion in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and its origin in Japanese and Northeast Asian populations. *Am J Med Genet A* 2005; 138: 344–348.
21. Bouchet C, Vuillaumier-Barrot S, Gonzales M et al. Detection of an Alu insertion in the *POMT1* gene from three French Walker Warburg syndrome families. *Mol Genet Metab* 2007; 90: 93–96.
22. Yanagisawa A, Bouchet C, Van den Bergh PY et al. New *POMT2* mutations causing congenital muscular dystrophy: identification of a founder mutation. *Neurology* 2007; 69: 1254–1260.
23. Manzini MC, Gleason D, Chang BS et al. Ethnically diverse causes of Walker-Warburg syndrome (WWS): FCMD mutations are a more common cause of WWS outside of the Middle East. *Hum Mutat* 2008; 29: E231–241.
24. Chung W, Winder TL, LeDuc CA et al. Founder Fukutin mutation causes Walker-Warburg syndrome in four Ashkenazi Jewish families. *Prenat Diagn* 2009; Epub ahead of print.

Correspondence:

Dr Jesús Cruces
Departamento de Bioquímica
Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” UAM-CSIC
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid,
Madrid, Spain.
Tel.: +34 91 4975406
fax: +34 91 5854401
e-mail: jesus.cruces@uam.es

(a)



(b)

WWS 1.1 y 2.1	RERERELHSPAQVDV	RNLSFMARFSELQWRML
<i>H. sapiens</i>	RERERELHSPAQVDV	SRNLSFMARFSELQWRML
<i>P. pygmaeus</i>	---W-----	---S-----
<i>B. taurus</i>	K---L-----T---	IS-----
<i>C. familiaris</i>	K---L-----M---	---S-----L-----
<i>E. caballus</i>	K---L-----T-M---	LS-----
<i>M. musculus</i>	K---L-----T-L---	IS-----K---
<i>O. anatinus</i>	K---L---L-T-I---	ISK-----K---
<i>G. gallus</i>	K---V-----TRM---	ISK-----K-T---KI-
<i>A. carolinensis</i>	K---A-----T-TS	IGQ---L-K-M---VNKR
<i>S. tropicalis</i>	S---Q---TSPHI---	---G-----S-W---K---
<i>D. rerio</i>	K---L---K---THS---	---NK---T---K-L---K---

(c)

<i>H. sapiens</i>	GYLGGFDGNFLWNRIGA
<i>P. pygmaeus</i>	-----
<i>B. taurus</i>	-----
<i>C. familiaris</i>	-----
<i>E. caballus</i>	-----
<i>M. musculus</i>	-W-----
<i>O. anatinus</i>	-----V-----
<i>G. gallus</i>	-----
<i>A. carolinensis</i>	-----
<i>S. tropicalis</i>	-----
<i>D. rerio</i>	A-LGG-----V-----
<i>P. marinus</i>	A---D-N---T-E---T
<i>B. floridae</i>	A-LG--N---T-E---
<i>L. gigantea</i>	-NYA-YE--ITLD---Q
<i>H. magnipapillata</i>	--FS----S-EFDK--Q
<i>N. vectensis</i>	A--S-Y----SFDD--Q
<i>Reniera sp.</i>	--WND---S--FST--E